

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-522969

(P2003-522969A)

(43) 公表日 平成15年7月29日 (2003.7.29)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

フォーマット (参考)

G 0 2 B 21/34

G 0 2 B 21/34

2 G 0 4 3

G 0 1 N 21/03

G 0 1 N 21/03

Z 2 G 0 5 4

21/64

21/64

E 2 G 0 5 7

F 2 H 0 5 2

21/78

21/78

Z

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全109頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-558715 (P2001-558715)

(86) (22) 出願日 平成13年2月12日 (2001.2.12)

(85) 翻訳文提出日 平成14年8月12日 (2002.8.12)

(86) 国際出願番号 PCT/US 01/04504

(87) 国際公開番号 WO 01/059432

(87) 国際公開日 平成13年8月16日 (2001.8.16)

(31) 優先権主張番号 60/181,631

(32) 優先日 平成12年2月10日 (2000.2.10)

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 イルミナ インコーポレイテッド

アメリカ合衆国 カリフォルニア州

92121-1975 サンディエゴ タウン セ

ンター ドライブ 9885

(72) 発明者 トッド・ディッキンソン

アメリカ合衆国 92122 カリフォルニア州サ

ンディエゴ、レボン・ドライブ 3435 番、ア

パートメント 1133

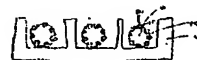
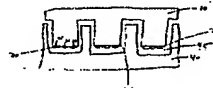
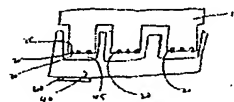
(74) 代理人 弁理士 青山 稔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ピーズをベースとしたアレイ・オブ・アレイズ用の代替基材およびフォーマット

(57) 【要約】

本発明は、数多くの試料の同時プロセッシングを許容する個々のアレイからなる複合アレイを含むセンサー組成物に関する。本発明は、さらに、複合アレイの製造方法および使用方法を提供する。本発明は、さらに、複合アレイと一緒に用いるためのハイブリダイゼーションチャンバーを提供する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 a) 顕微鏡用スライドの寸法にフォーマットされている、50  $\mu$ m未満の間隔で離れている別個の部位を含む表面をもつ基材；および

b) 少なくとも第1亜集団および第2亜集団を含むマイクロスフェアの集団であって、該第1亜集団が第1生物活性因子を含み、該第2亜集団が第2生物活性因子を含み、該マイクロスフェアが表面上にランダムに分布している集団を含む、顕微鏡用スライド組成物。

【請求項2】 部位が25  $\mu$ m未満の間隔で離れている請求項1記載の組成物。

【請求項3】 部位が15  $\mu$ m未満の間隔で離れている請求項1記載の組成物。

【請求項4】 部位が少なくとも約5  $\mu$ mの間隔で離れている請求項1、2または3記載の組成物。

【請求項5】 a) 顕微鏡用スライドの寸法にフォーマットされている、別個の部位を含む表面をもつ基材；

b) 少なくとも第1亜集団および第2亜集団を含むマイクロスフェアの集団であって、該第1亜集団が生物活性因子を含み、第2亜集団が生物活性因子を含まず、該マイクロスフェアが表面上にランダムに分布している集団を含む、顕微鏡用スライド組成物。

【請求項6】 第1亜集団の第1マイクロスフェアの中心と第2マイクロスフェアの中心との間の距離が少なくとも5  $\mu$ mである請求項1または5記載の組成物。

【請求項7】 第1亜集団の第1マイクロスフェアと第2マイクロスフェアとの間の距離が約100  $\mu$ m未満である請求項6記載の組成物。

【請求項8】 基材が、さらに、第1アッセイ位置および第2アッセイ位置を含み、第1亜集団および第2亜集団が第1アッセイ位置および第2アッセイ位置に分布されている請求項1または5記載の組成物。

【請求項9】 第1亜集団の第1マイクロスフェアと第2マイクロスフェアとの間の距離が約100  $\mu$ m未満である請求項8記載の組成物。

【請求項10】 第1亜集団の第1メンバーと第2メンバーとの間の距離が約50  $\mu$ m未満である請求項9記載の組成物。

【請求項11】 第1亜集団の第1メンバーと第2メンバーとの間の距離が約15  $\mu$ m未満である請求項9記載の組成物。

【請求項12】 第1亜集団の第1メンバーと第2メンバーとの間の距離が少なくとも約5  $\mu$ mである請求項9、10または11記載の組成物。

【請求項13】 第2亜集団が検出可能なシグナルを含む請求項5記載の組成物。

【請求項14】 第2亜集団が検出可能なシグナルを含まない請求項5記載の組成物。

【請求項15】 a) 検出器；および  
b) 該検出器中にある請求項1または5記載の組成物を含む装置。

【請求項16】 a) 顕微鏡用スライドの寸法にフォーマットされている、ウェルを含む表面をもつ基材を準備すること；

b) 個々のウェルがマイクロスフェアを含むように基材上に、少なくとも第1亜集団および第2亜集団を含むマイクロスフェアであって、該第1亜集団が生物活性因子を含み、該第2亜集団が生物活性因子を含まないマイクロスフェアをランダムに分布させること  
を含む、顕微鏡用スライド組成物の製造方法。

【請求項17】 第1亜集団が、さらに、それぞれが第1生物活性因子および第2生物活性因子を含む第1次亜集団および第2次亜集団を含む請求項16記載の方法。

【請求項18】 a) 顕微鏡用スライドの寸法にフォーマットされている、50  $\mu$ m未満の間隔で離れている別個の部位を含む表面をもつ基材を準備すること；ならびに

b) 少なくとも第1亜集団および第2亜集団を含むマイクロスフェアであって、第1亜集団が第1生物活性因子を含み、第2亜集団が第2生物活性因子を含むマイクロスフェアの集団をランダムに分布させること

を含む、顕微鏡用スライド組成物の製造方法。

【請求項19】 ウェルが25  $\mu$ m未満の間隔で離れている請求項18記載の方法。

【請求項20】 ウェルが15  $\mu$ m未満の間隔で離れている請求項18記載の方法。

【請求項21】 第1亜集団と第2亜集団との比率が少なくとも1:36である請求項18記載の方法。

【請求項22】 第1亜集団と第2亜集団との比率が少なくとも1:100である請求項18記載の方法。

【請求項23】 第1亜集団の第1マイクロスフェアの中心と第2マイクロスフェアの中心との間の距離が少なくとも5  $\mu$ mである請求項18記載の方法。

【請求項24】 第1亜集団の第1マイクロスフェアの中心と第2マイクロスフェアの中心との間の距離が少なくとも15  $\mu$ mである請求項18記載の方法。

【請求項25】 第1亜集団の第1マイクロスフェアと第2マイクロスフェアとの間の距離が少なくとも50  $\mu$ mである請求項18記載の方法。

【請求項26】 a) 少なくとも第1穴および第2穴を含む基材であって、第1穴および第2穴の直径がそれぞれ第1光ファイバー束および第2光ファイバー束の直径と等しい直径である基材を準備すること；

b) 第1光ファイバー束および第2光ファイバー束をそれぞれ第1穴および第2穴に挿入すること；ならびに

c) 第1光ファイバー束および第2光ファイバー束の横断面が基材によって囲まれるように基材を切断すること

を含む、顕微鏡用スライドアレイの製造方法。



## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本願は、2000年2月10日に出願した米国出願番号第60/181,631号の利益を請求する（出典明示により全内容を本明細書の記載とする）。

## 【0002】

## （技術分野）

本発明は、多数の試料の同時プロセッシングを見こむことができる個々のアレイからなる複合アレイを含むセンサー組成物に関する。さらに、本発明は、複合アレイの製造および使用方法を提供する。本発明は、顕微鏡用スライドアレイおよび顕微鏡用スライドアレイの製造方法を提供する。

## 【0003】

## （背景技術）

流体および気体中の特定物質の存在および／または濃度の検出のための数多くのアッセイおよびセンサーがある。これらのうちの多くは、検出メカニズムとして特定リガンド／抗リガンド反応に頼る。すなわち、物質の対（すなわち、結合対またはリガンド／抗リガンド）は、お互いに結合し合うが他の物質にはあまりまたは全く結合しないことが知られている。このことは、複合体の検出のためにこれらの結合対を用いる数多くの技法の中心であった。これらは、一般に、ある方法で複合体の一成分を標識して、例えば、放射性同位体、蛍光性および他の光学活性分子、酵素などを用いて、複合体全体を検出可能にすることによって行われる。

## 【0004】

これらのセンサーにおいてルミネセンスを用いる検出メカニズムが特に有用である。最近、特に、この10年のうちに、光ファイバーおよび光ファイバーストランドと化学分析的判定用の吸光性色素との併用が急速に発展してきた。かかる目的および技法のための光ファイバーの使用は、Milanovich et al., "Novel Optical Fiber Techniques For Medical Application", Proceedings of the SPIE 28th Annual International Technical Symposium On Optics and Electro-Optics, Volume 494, 1980; Seitz, W. R., "Chemical Sensors Based On Immobil

ized Indicators and Fiber Optics" in C. R. C. Critical Reviews In Analytical Chemistry, Vol. 19, 1988, pp. 135-173; Wolfbeis, O. S., "Fiber Optical Fluorosensors In Analytical Chemistry" in Molecular Luminescence Spectroscopy, Methods and Applications (S. G. Schulman, editor), Wiley & Sons, New York (1988); Angel, S. M., Spectroscopy 2 (4):38 (1987); Walt, et al., "Chemical Sensors and Microinstrumentation", ACS Symposium Series, Vol. 403, 1989, p. 252. および Wolfbeis, O. S., Fiber Optic Chemical Sensors, Ed. CRC Press, Boca Raton, FL, 1991, 2nd Volume に開示されている。

【0005】

さらに最近、1束の別個の光ファイバー束と一緒に複数の色素を使用可能にする光ファイバーセンサーが構築された。Walt et al.の米国特許第5,244,636号および第5,250,264号には、束の遠位端に複数の異なる色素を付加するための系が開示されている（これらの特許の各教示内容は出典明示により本明細書の記載とする）。この開示された構成は、束の光ファイバーを分けて個々の色素と光学的にアクセスすることができる。これは、各色素が異なる分析物に対して敏感である2種類またはそれ以上の色素からのシグナルを合わせた場合に生じる各色素からの反射光中の別々のシグナルを解析するという課題を回避する；色素の発光スペクトルは有意に重複している。

【0006】

米国出願第08/818,199号および第09/151,877号には、基材表面上、例えば、個々のファイバーが各々光学サインを含有するビーズを含む光ファイバー束の末端でマイクロスフェアまたはビーズを用いるアレイ組成物が記載されている。ビーズはランダムに衰微するので、アレイを「解読 (decode)」するために固有の光学サインが必要である；すなわち、アレイを調製した後、該アレイ上の個々の部位の位置と特定部位でのビーズまたは生物活性因子とを相互に関係付けることができる。これは、アレイ上にビーズをランダムに分布できることを意味し、従来技術の in situ 合成法またはスポッティング法のいずれと比較しても迅速かつ安価な方法である。以下にさらに詳しく概説するように、該アレイにビーズを負

荷するとすぐに、該アレイを解読することができるか、または、該アレイを用いて試験後に完全または部分解読を引き起こすことができる。

【0007】

加えて、マイクロタイタープレート中に複数のプローブアレイを含むシリコンウェハーを含む組成物が米国特許第5,545,531号に開示されている。

【0008】

(発明の概要)

上記目的に従って、本発明は、顕微鏡用スライドの寸法にフォーマットされている、 $50\mu\text{m}$ 未満の間隔で離れている別個の部位を含む表面をもつ基材、ならびに少なくとも第1亜集団および第2亜集団を含むマイクロスフェアの集団であって、該第1亜集団が第1生物活性因子を含み、該第2亜集団が第2生物活性因子を含み、該マイクロスフェアが表面上にランダムに分布している集団を含む顕微鏡用スライド組成物を提供する。

【0009】

加えて、本発明は、顕微鏡用スライドの寸法にフォーマットされている、別個の部位を含む表面をもつ基材、ならびに少なくとも第1亜集団および第2亜集団を含むマイクロスフェアの集団であって、該第1亜集団が生物活性因子を含み、第2亜集団が生物活性因子を含まず、該マイクロスフェアが表面上にランダムに分布している集団を含む顕微鏡用スライドを提供する。

【0010】

加えて、本発明は、顕微鏡用スライドの寸法にフォーマットされている、ウェルを含む表面をもつ基材を準備すること；ならびに個々のウェルがマイクロスフェアを含むように基材上に、少なくとも第1亜集団および第2亜集団を含むマイクロスフェアであって、該第1亜集団が生物活性因子を含み、該第2亜集団が生物活性因子を含まないマイクロスフェアをランダムに分布させることを含む、顕微鏡用スライド組成物の製造方法を提供する。

【0011】

また、本発明は、顕微鏡用スライドの寸法にフォーマットされている、 $50\mu\text{m}$ 未満の間隔で離れている別個の部位を含む表面をもつ基材を準備すること；な

らびに少なくとも第1亜集団および第2亜集団を含むマイクロスフェアであって、第1亜集団が第1生物活性因子を含み、第2亜集団が第2生物活性因子を含むマイクロスフェアの集団をランダムに分布させることを含む、顕微鏡用スライド組成物の製造方法を提供する。

【0012】

加えて、本発明は、少なくとも第1穴および第2穴を含む基材であって、第1穴および第2穴の直径がそれぞれ第1光ファイバー束および第2光ファイバー束の直径と等しい直径である基材を準備すること；第1光ファイバー束および第2光ファイバー束をそれぞれ第1穴および第2穴に挿入すること；ならびに第1光ファイバー束および第2光ファイバー束の横断面が基材によって囲まれるように基材を切断することを含む、顕微鏡用スライドアレイの製造方法を提供する。

【0013】

(図面の簡単な説明)

図1A、1B、1C、1Dおよび1Eは、本発明のいくつかの異なる「二成分」系の実施態様を示す図である。図1Aにはビーズアレイが示されている。第1基材10は、ウェル25およびビーズ30を有するアレイ位置20を有する。第2基材40は、アッセイ位置45を有する。光学レンズまたはフィルター60もまた示されている；当業者に理解されるように、これは、基材に対して内部にあってもよい。図1Bは、ビーズを用いないことを除いて類似している；アレイ位置20は、スポッティング法、プリンティング法、写真平版法などを用いて形成できる別個の部位21、22、23などを有する。図1C～Fは、複数の第1基材の使用を示す。図1Cは、混合機能のためのさらなる使用を有する「ビーズ・オブ・ビーズ (bead of beads)」を示す。図1Dは、複数のビーズアレイを示し、図1Eは、複数の非ビーズアレイを示す。図1Fは、第1基材10を第2基材40上の位置に「向ける (target)」ための結合官能基の使用を示す；当業者によって理解されるように、これは、平らな第2基材または区分された第2基材上で行うことができる。図1Fは、結合リガンド対70/70'、71/71'、72/72'などを用いる。これらは、化学官能基または生物学的官能基のいずれであってもよく、例えば、オリゴヌクレオチドなどのようなIBL/DBL対

について記載される。

【0014】

図2Aおよび図2Bは、2つの異なる「一成分」系を示す。図2Aは、基材がビーズ30を含むウェル25を有するアッセイ位置45をもつビーズアレイを示す。図2Bは、非ビーズアレイを示す；各アッセイ位置45は、別個の部位21、22、23などを示す。

【0015】

図3は、ハイパースペクトルアルファ空間におけるクラスター形成を示す ( $\alpha_1 = I_1 / \sum I_i$ 、 $\alpha_2 = I_2 / \sum I_i$ 、 $\alpha_3 = I_3 / \sum I_i$  など)。ファイバー束上に存在する128種類のビーズ1セットを、4種類の色素 (Bodipy-493、Bodipy-R6G、Bodipy-TXR、およびBod-564) で標識した相補オリゴヌクレオチドのハイブリダイジングセットによって解読した (オリゴヌクレオチド1個につき色素1種類だけ)。ビーズ4013個を解読した4段階解読の第2段階を示す。色相クラスター域の周囲に卵形線が描かれている。

【0016】

図4は、FAM標識オリゴ補体またはCy3標識オリゴ補体のいずれかを用いてアレイ上の異なる種類のビーズを彩色 (標識) する二色解読法を示す。

【0017】

図5は、4種類の色および4つの解読段階を用いる128種類のビーズの解読を示す (差し込み図は、16種類のビーズを解読するために4種類の色素を用いる単一の解読段階を示す)。

【0018】

図6は、16種類のビーズのグレースケール解読を示す。(A) 相補的な解読オリゴについてのコンビナトリアルプールリングスキーム。(B) 2つの独立した標準化画像が得られ、得られたビーズ強度を比較した。(C) (A) に記載した3つの解読段階についてアルファ値 (標準化画像における強度に対する所定の解読段階におけるビーズ強度の比) をプロットする。

【0019】

図7は、蓋およびベースプレートを略図的に示す。A：ハイブリダイゼーションチャンバーの蓋10およびベースプレート60を示す。蓋における口20は、蓋を介して光ファイバー束30を挿入させ、ベースプレート60のベースキャビティ50中のマイクロタイター40のウェル中の試料を接触させる。B：ベースプレート60のベースキャビティ50を示す。

【0020】

図8は、蓋10およびベースプレート60を含むハイブリダイゼーションチャンバーを略図的に示す。また、周囲シール80、クランプ90およびクランプレセプタクル95、蓋を介してマイクロタイタープレート40のウェル中に挿入された光ファイバー束30を示す。

【0021】

図9は、穴105を有するベースプレートを示す。A：ベースプレートにおける穴105を示す。B：穴105を連結しているチャンネル100を示す。

【0022】

図10は、加圧および／または減圧によって引き起こされる膜上の可変の溶液容積および局在化を示す。A：+Pが加圧を示し；-Pが減圧を示す。全てのチャンバーおよび穴において加圧に応答して膜が上方に曲がる。B：左チャンバーに減圧を適用し、中央および右チャンバーに加圧を適用すると、流体は膜の左側に移動する。C：まず、左部分に減圧を適用すると、流体は、ウェルを満たす。次に、中央および右チャンバーに減圧を適用すると、空のウェルが形成される。D：中心に減圧を適用し、左および右チャンバーに加圧を適用すると、流体は膜の中央に移動する。E：中心における高減圧によって形成されたウェルが流体で満たされる。低減圧を適用すると、左および右にからのウェルが形成される。F：右チャンバーに減圧を適用し、左および中央チャンバーに加圧を適用すると、流体が右側に移動する。

【0023】

図11は、ハイブリダイゼーションチャンバーについての使用を見出す代表的なアッセイスキームのフローチャートを示す。

図12は、顕微鏡用スライドフォーマットにおけるアレイ・オブ・アレイズを

示す。

図13は、アレイを調製するための金型を示す。

【0024】

(発明の詳細な記載)

本発明は、数多くの試料に対する同時分析、すなわち、連続プロセッシングよりもむしろ並行プロセッシングを許容することができる非常に高密度なアレイの形成に関する。これは、多くの試料のプロセッシングを許容するように形成されている、「アレイ・オブ・アレイズ (array of arrays<sup>TM</sup>)」、すなわち、複数の個々のアレイを含む複合アレイを形成することによって行われる。例えば、個々のアレイは、各々、マイクロタイタープレートの各ウェル内に存在している。かくして、マイクロタイタープレートの大きさおよび個々のアレイの大きさに依存して非常に多数のアッセイを同時に行うことができる；例えば、2,000種類の異なった種の個々のアレイ（高いレベルの重複性が組込まれている）および96ウェルマイクロタイタープレートを用いて、192,000個の実験を一度に行うことができる；384マイクロタイタープレート中の同一のアレイは、768,000個の同時実験を行い、1536マイクロタイタープレートは、3,072,000個の実験を行う。

【0025】

一般的に、本発明のアレイ組成物は、いくつかの方法で形成することができる。好ましい実施態様において、以下にさらに詳しく概説するように、「一成分」系が用いられる。すなわち、マイクロタイタープレートのような、複数のアッセイ位置（本明細書において、しばしば、「アッセイウェル」と称することもある）を含む第1基材を各アッセイ位置が個々のアレイを含有するように形成する。かくして、該アッセイ位置とアレイ位置とは同じである。例えば、プラスチック材料製マイクロタイタープレートを、アッセイウェルの各底に複数の「ビーズウェル」を含有するように形成することができる。以下にさらに詳しく記載するように、次いで、生物活性因子を含有するビーズを、各アッセイ位置におけるビーズウェル中に負荷することができる。本明細書の記載は、ビーズの使用を強調しているが、本発明の実施態様の全てにおいてビーズを用いることが必要なわけで

はないことに注目すべきである；生物活性因子を直接アレイ位置に結合させることができる。例えば、他の種類のアレイは、よく知られており、このフォーマットにおいて用いることができる；スポットされたアレイ、プリントされたアレイまたは写真平版アレイがよく知られている；WO 95/25116；WO 95/35505；PCT US 98/09163；米国特許第5,700,637号；第5,807,522号および第5,445,934号；および米国出願番号第08/851,203号、09/187,289号；ならびにその中で引用されている文献を参照のこと（これらの全ては出典明示により明らかに本明細書の記載とする）。一成分系において、ビーズを用いない場合、好ましい実施態様は、非シリコンウェハース基材を用いる。

【0026】

別法として、「二成分」系を用いることができる。この実施態様において、個々のアレイを第2基材の上に形成し、次いで、第1マイクロタイタープレート基材中に装着または「浸漬」させることができる。当業者によって理解されるように、種々のアレイフォーマットおよび形態を用いることができる。好ましい実施態様は、個々のアレイとして、生物活性因子を含有するビーズを光ファイバー束の端部に負荷するように一般に個々のファイバーの各々の一表面中にエッチングされた「ビーズウェル」を有する光ファイバー束を用いる。かくして、複合アレイは、マイクロタイタープレートのウェル中に適合するように形成される多数の個々のアレイを含む。別法として、二成分系において他の種類のアレイフォーマットを用いることができる。例えば、スポットティング法、プリンティング法または写真平版法によって調製されるような規則的アレイを上記で概説した第2基材上に置くことができる。さらにまた、図1C～Fに示すように、ランダムまたは規則的のいずれかのアレイの「片」を第1基材として用いることができる。

【0027】

本発明、一般に、種々の化学官能基を担持するマイクロスフェアとも称されるビーズが、個々のマイクロスフェアを結合することができる別個の部位のパターン化された表面を含む基材上に分布されている、ビーズをベースとした分析化学を含む従前の研究に基づいている。一般に、ビーズは、基材上にランダムに置かれ、かくして、該アレイを「解読（decode）」するのに数種類の方法を用いるこ



とができる。一の実施態様において、いずれかの特定のビーズ上の化学官能基を同定するために用いることができる固有の光学サイン、一般に、蛍光色素をビーズ中に取り込む。これは、アレイ上の位置から分離されるべき候補因子（すなわち、核酸および抗体のような化合物）の合成を許容する。すなわち、候補因子をビーズ上で合成し、次いで、該ビーズをパターン化された表面上にランダムに分布させる。まず、ビーズを光学サインで被覆するので、これは、後にアレイを「解読」することができることを意味する。すなわち、アレイを調製した後、アレイ上の個々の部位の位置とその特定部位でのビーズまたは候補因子とを相互に関係付けることができる。これは、ビーズをアレイ上にランダムに分布することができることを意味し、従来技術の *in situ* 合成法またはスポッティング法のいずれと比較しても迅速かつ安価な方法である。これらの方法は、PCT/US98/05025；PCT/US98/21193；PCT/US99/20914；PCT/US99/14387；および米国出願番号第08/818,199号；第09/315,584号；および第09/151,877号に概説されている（これらの全ては出典明示により明らかに本明細書の記載とする）。加えて、本明細書は、一般に、ビーズの使用について検討されているが、同一形態を細胞および他の粒子に対して適用することができる；例えば、PCT/US99/04473 を参照のこと。

【0028】

これらの系において、生物活性因子の配置は一般にランダムであり、かくして、コード化／解読系は、アレイにおける各位置での生物活性因子を同定することが必要とする。これは、以下にさらに詳しく概説するように、種々の方法で行うことができ、一般に、a) ビーズに付着した生物活性因子またはアイデンティファイアー結合リガンド (IBL) に結合する、一般に、直接標識されたデコーディング結合リガンド (DBL) の使用；b) 以下にさらに詳しく概説するように、例えば、ビーズの位置を標的にすることによる（例えば、光活性性または光切断性成分を用いてビーズの特定位置への選択的付加を許容することによる）か、または、サブバンドルもしくは部位の選択的負荷を用いることによる位置解読；c) 標的と結合するこれらのビーズだけを解読する選択的解読；またはd) これらのいずれかの併用を包含する。以下にさらに詳しく概説するように、場合によっては、この解読が全てのビーズに対して、または、特定の標的分析物を結合す

るビーズだけに対して生じてもよい。同様に、これは、標的分析物の付加の前または後のいずれで生じてもよい。

【0029】

一旦アレイ中の各ミクロスフェアの同一性（すなわち、実際の因子）および位置が決定されれば、アレイを標的分析物を含有する試料に曝露するが、上記のように、これは分析の前または間にも実施できる。標的分析物は、以下でより詳細に記載するように、生物活性因子に結合し、特定のビーズの光学的シグナルの変化を生じる。

【0030】

本発明において、「デコーディング」には光学的シグネチャー、デコーディング工程の間に添加されるデコーディング結合リガンド、またはこれらの方法の組合せを使用し得る。デコーディング結合リガンドは、ビーズ上に配置された異なる同定結合リガンドパートナー、または、例えばビーズが一本鎖核酸を生物活性因子として含む場合、生物活性因子自体のいずれかに結合する。デコーディング結合リガンドは直接的または間接的のいずれかで標識され、従ってデコーディングは標識の存在を検出することによって生じる。デコーディング結合リガンドのプールを逐次的に使用することによって、必要とされるデコーディング工程数を大いに最小化することが可能である。

【0031】

従って、本発明は、複数のアッセイ位置を含む表面を有する第1の基材を少なくとも含む複合アレイ組成物を提供する。本明細書において「アレイ」は、アレイ形式の複数の候補因子を意味する；アレイのサイズはアレイの構成および最終用途に依存する。約2個から数百万個の異なる生物活性因子を含むアレイ（例えば、異なるビーズ）を作製することができ、非常に大きなアレイが可能である。一般に、アレイは、ビーズのサイズ、基材およびアレイの最終用途に依存して2個から10億個以上までを含む。従って、超高密度、高密度、中密度、低密度および超低密度アレイを作製してもよい。超高密度アレイの好ましい範囲は約10,000,000～約2,000,000であり（数字は全て平方cm）、約100,000,000～約1,000,000,000が好ましい。高

密度アレイは約100,000～約10,000,000の範囲であり、約1,000,000～約5,000,000が特に好ましい。中密度アレイは好ましくは約10,000～約100,000の範囲であり、約20,000～約50,000が特に好ましい。低密度アレイは一般に10,000未満であり、約1,000～約5,000が好ましい。超低密度アレイは1,000未満であり、約10～約1000が好ましく、約100～約500が特に好ましい。いくつかの実施態様において、本発明の組成物はアレイ形式でなくてもよい；すなわち、いくつかの実施態様について、単一の生物活性因子を含む組成物を作製してもよい。さらに、いくつかのアレイにおいて、異なるかまたは同一の組成物のいずれかの、複数の基材を使用してもよい。従って、例えば、大きなアレイは複数のより小さな基材を含んでもよい。

#### 【0032】

さらに、本発明の組成物の1つの利点は、特に光ファイバー技術の使用を介して、非常に高密度のアレイを作製することができることである。従って、例えば、200 $\mu$ m以下のビーズを使用でき(200nmのビーズが可能である)、非常に小さなファイバーが知られているので、1mm<sup>2</sup>の光ファイバーバンドル中に40,000～50,000以上(いくつかの場合、百万)の異なるファイバーおよびビーズを有することが可能であり、0.5cm<sup>2</sup>当たり15,000,000(いくつかの場合2千5百万～5千万)の個々のビーズおよびファイバーより高い密度が得られる。

#### 【0033】

本明細書において「複合アレイ」または「組合せアレイ」または文法上等価な語は、上記のような複数の個々のアレイを意味する。一般に、個々のアレイの数は使用するマイクロタイタープレートのサイズによって設定される；従って、96ウェル、384ウェルおよび1536ウェルマイクロタイタープレートは96個、384個および1536個の個々のアレイを含む複合アレイを利用するが、当業者に理解されるように、各マイクロタイターウェルが個々のアレイを含む必要はない。複合アレイが同一、類似または異なる個々のアレイを含み得ることに留意すべきである。すなわち、いくつかの実施態様において、同じ2,000回

のアッセイを96個の異なる試料に対して実施するか；あるいは192,000回の実験を同じ試料（すなわち、96ウェルの各々中の同じ試料）に対して実施することが望ましくあり得る。あるいは、重複性／品質管理のために、複合アレイの各行または列が、同じであり得る。当業者に理解されるように、システムを配置するための種々の方法が存在する。さらに、アレイのランダムな性質は、ビーズの同じ集団を2つの異なる表面に添加し、実質的に類似するがおそらく同一ではないアレイを生じさせ得ることを意味し得る。

【0034】

本明細書において「基材」または「固体支持体」または他の文法上等価な語は、ビーズの結合または会合に適切な分離した個々の部位を含むように修飾可能であり、少なくとも1つの検出方法に使用可能ないずれかの材料を意味する。当業者に理解されるように可能な基材の数は非常に多い。可能な基材は、限定するものではないが、ガラスおよび修飾または官能基付与ガラス、プラスチック（アクリル、ポリスチレンおよびスチレンと他の材料とのコポリマー、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリブチレン、ポリウレタン、テフロン（登録商標）Jなどを含む）、多糖、ナイロンまたはニトロセルロース、樹脂、シリカまたはシリカベースの材料（シリコンおよび修飾シリコンを含む）、炭素、金属、無機ガラス、プラスチック、光ファイバーバンドルならびに種々のその他のポリマーを含む。一般に、基材は光学的検出を可能にし、それ自体は認識可能な蛍光を発しない。

【0035】

好ましい実施態様において、基材は金属（限定するものではないが、アルミニウムまたはステンレススチールを包含する）、シリコン、ガラス、いずれかのポリマーベースの材料、または本明細書に記載のいずれかの基材材料から作製される。好ましい実施態様において、基材は熱硬化性または熱可塑性ポリマーから作製される。アレイは当該分野において公知のマイクロファブリケーション技術によって調製される。この技術は、限定するものではないが、射出成形、ホットエンボシング、UVリソグラフィ、表面マイクロマシン、光重合、エッチング、マイクロステオリソグラフィおよび電気メッキを包含する。好ましい実施態様において

、当該分野において公知のマスクを使用した写真印刷によって基材上にウェルを形成させる。広範な基材が利用可能であるが、好ましくは所望の光学的特性を有する基材が選択される。すなわち、限定するものではないが、低い自己蛍光を有すること、または不透明もしくは反射性であることを包含する特性を有する基材が選択される。さらに、いくつかの実施態様において、特定の機械的特性（例えば、剛性）が好ましい。さらに、表面の金属コーティングを用いてアレイからのシグナル収集を増強することができる。また、いくつかの実施態様において、アレイの表面を修飾してアレイの可湿性を改善する。可湿性の改善方法は、限定するものではないが、酸腐食またはイオン衝撃を包含する。好ましい実施態様において、基材は標準的な顕微鏡スライドの形態または寸法である。

【0036】

さらに、基材上の部位またはウェルの形状をシグナルの生成を変化させるように修飾することができる。すなわち、ウェルの形状を四角、丸または多角形にすることができる。シグナルの出力および／または検出を改善するためのこれらおよびさらなる表面の修飾はUS SN 09/651, 181（2000年8月30日出願）およびPCT/US 00/23830（2000年8月30日出願）（出典明示で援用する）により詳細に記載されている。

【0037】

一般に、基材は平ら（平面）であるが、当業者に理解されるように、基材の他の立体配置を使用してもよい；例えば、試料のビーズへの接近を可能にするプラスチックの多孔性ブロック中にビーズを包埋し、検出用に共焦点顕微鏡を使用することによって三次元立体配置を使用することができる。同様に、素通り試料分析のために、ビーズをチューブの内側表面に配置して試料容積を最小化してもよい。好ましい基材は、下記の光ファイバーバンドル、ならびに平面基材（例えば、ガラス、ポリスチレンおよび他のプラスチックおよびアクリル）を包含する。いくつかの実施態様において、シリコンウェハー基材は好ましくない。1つの実施態様において、基材は顕微鏡スライドの形状であるかまたは顕微鏡スライドである（図12参照）。

【0038】

すなわち、好ましい実施態様において、基材は顕微鏡スライドであるかまたは標準的な顕微鏡スライドと実質的に同じ寸法の基材である。当業者に理解されるように、顕微鏡スライドは約3"または約7.5cmかける約1"または2.5cmで厚さ約0.04"または約1mmであるが、異なる寸法を使用することができる。従って、好ましい実施態様において、本発明の基材は約7.5cmかける2.5cmかける約1mmである(図12)。このサイズの基材を使用する利点は、既存の機器、すなわち検出器を使用して基材上のシグナルを分析することである。すなわち、既存のスキャニングベースの機器(限定するものではないが、General Scanning、Molecular Dynamics、Gene Machine、Genetic Microsystems、Vysis、AxonおよびHewlett-Packardによって販売されるものを包含する)を使用して本発明のアレイを分析することができる。

#### 【0039】

第1の基材は複数のアッセイ位置、すなわち標的分析物の検出のためのアッセイが生じる位置を含む表面を含む。アッセイ位置は一般に、例えばマイクロタイタープレート中のアッセイウェルのように互いに物理的に分離しているが、他の立体配置(疎水性/親水性など)を使用してアッセイ位置を分離することができる。

#### 【0040】

しかし、アッセイ位置がマイクロタイタープレートのウェルに限定される必要はない。すなわち、基材上のいずれかの分離可能な位置がアッセイ位置として作用する。分離可能な位置は、基材上の他の領域から物理的に分離した基材上の位置を意味する。物理的分離はアッセイ位置間のいずれかの境界であり得る。分離は区分であり得、あるいは分離は単に、少なくとも一方を他方から区別するために十分なアッセイ位置の間隔であり得る。各アッセイ位置において溶液を分離して維持することが望ましい場合、1つのアッセイ位置に送達された試薬が別のアッセイ位置に相互汚染しないように十分な分離が存在することのみが必要とされる。しかし、いくつかの実施態様においてはそのような物理的障害は必要ではなく、いくつかの場合では所望もされない。アッセイ位置は一方から他方を区別す

るために十分に分離されていることのみが必要である。区分または境界がアッセイ位置間で使用される場合、好ましい境界は、限定するものではないが以下を包含する：アッセイ位置を取り囲む疎水性領域；アッセイ位置間の試料の移動を防止するために十分な幅および高さのうねもしくはへり；またはアッセイ位置間の試料の移動を防止するために十分な幅および深さのみぞ。いくつかの実施態様において、境界は、限定するものではないが、ゴムまたはシリコンを包含するガスケットから作製される。すなわち、好ましい実施態様において、境界は、基材のウェル間の試料または試薬の漏れを防止するための密封機構を含む。当業者に理解されるように、これは種々の異なる形態を取り得る。1つの実施態様において、アレイを含む基材上にガスケットが存在する（シート、チューブまたはストリップを含む）。あるいは、ゴムまたはシリコンのストリップまたはチューブを使用してもよい。1つの実施態様において、基材は、ガスケットを合わせる刻みまたは溝を含む。さらに、ガスケットを基材に結合させるために接着剤を使用することができる。アッセイ位置を取り囲むために疎水性領域を使用する場合、疎水性領域は有効に溶液を含むかまたは溶液を疎水性領域によって取り囲まれた領域内に含まれる部位に局在化させる。いくつかの実施態様において、境界または区分は、限定するものではないがゲルを包含する印刷可能材料から作製される。

【0041】

また、いくつかの実施態様において、ウェル間の液体の流動のために溝を提供することが望ましい。この実施態様において、溝は本明細書に記載のように基材にエッチングできる。別の実施態様において、所望の液体誘導経路を作製するために印刷技術を使用する；すなわち、印刷材料のパターンによって、方向付けられた液体輸送を可能にすることができる。従って、「インク」の集結によって流動溝を規定することができる。さらに、異なる「インク」または「ペースト」の使用によって経路の異なる位置が異なる流動特性を有するようにすることができる。液体誘導経路中の試薬の保持時間を改変することが所望される場合、多材料液体誘導経路を使用することができる。さらに、試薬を「インク」中に含めることによって、または次の印刷工程によって、印刷した液体誘導経路も試薬物質を含有する領域を提供することができる。例えば、米国特許第5,795,453

号（出典明示で援用する）を参照のこと。

【0042】

1つの実施態様において、アッセイ位置は基材中のくぼんだ領域である。本明細書に記載のように、くぼんだ領域またはアッセイ位置は分離した部位またはウェルを含む。

【0043】

好ましい実施態様において、基材上のアッセイ位置は光ファイバーバンドルである。すなわち、光ファイバーバンドルを、以下でより詳細に記載するように、基材に結合するかまたは基材に挿入し、分離したアッセイ位置を形成する。全ての実施態様において必要とされるわけではないが、いくつかの実施態様において、光ファイバーバンドルは、限定するものではないが、上記のもの（例えば、疎水性領域、うねまたはみぞ）を包含する区分によって互いに物理的に分離している。あるいは、各ファイバーバンドルは一方から他方を区別するために十分な距離によって分離されている。

【0044】

好ましい実施態様において、第2の基材は光ファイバーバンドルまたはアレイであり、これはU. S. S. N. 08/944, 850および08/519, 062、PCT US98/05025およびPCT US98/09163（出典明示で援用する）に一般的に記載されている。好ましい実施態様は事前形成ユニタリー光ファイバーアレイを利用する。本明細書において、「事前形成ユニタリー光ファイバーアレイ」は、同軸配置され、その長さに沿って連結された分離した個々の光ファイバーストランドのアレイを意味する。一般にファイバーストランドは個々に被覆されている。しかし、事前形成ユニタリーアレイと他の光ファイバー形式を区別する1つの事項は、ファイバーが個々に物理的に操作可能でないことである；すなわち、1つのストランドは一般にその長さに沿ったいかなる点においても別のファイバーストランドから物理的に分離できない。

【0045】

しかし、いくつかの「2成分」の実施態様において、第2の基材は光ファイバーアレイではない。



## 【0046】

好ましい実施態様において、アッセイ位置（「1成分システム」の）またはアレイ位置（「2成分システム」の）は複数の分離した部位を含む。従って、前者の場合、上記のように、アッセイ位置はアレイ位置と同じである。後者の場合、アレイ位置をアッセイ位置に別個に適合させる。これらの実施態様において、基材の少なくとも1つの表面は、後のミクロスフェアの会合のために（または、ミクロスフェアを使用しない場合は生物活性因子の結合のために）、分離した個々の部位を含むように修飾される。これらの部位は、物理的に変化した部位、すなわち物理的立体配置、例えばミクロスフェアがウェル中に留まることのできるようにビーズを保持できる基材中のウェルまたは小さなくぼみ、または他の力（磁気力もしくは圧縮力）の使用、または化学的に変化したもしくは活性な部位、例えば化学的官能基付与部位、静電的に変化した部位、疎水性／親水性官能基付与部位、接着剤のスポットなどを含んでもよい。

## 【0047】

部位はパターン、すなわち規則正しいデザインもしくは立体配置であってもよく、またはランダムに分布していてもよい。好ましい実施態様は、部位にX-Y座標平面においてアドレスし得るように、規則正しい部位のパターンを利用する。この意味での「パターン」は、繰り返し単位セル、好ましくは基材上でのビーズの高密度を可能にするものを含む。しかし、これらの部位が分離した部位でなくともよいことに留意すべきである。すなわち、例えば、いずれかの位置でのビーズの結合を可能にする接着剤または化学官能基の均質な表面を使用することが可能である。すなわち、基材の表面は、個々の部位における（これらの部位が他の部位と連続的であっても不連続であっても）ミクロスフェアの結合を可能にするように修飾される。従って、基材の表面は、単一の会合したビーズのみを有することができる分離した部位が形成されるように修飾されていてもよく、あるいは基材の表面は修飾され、ビーズはどこにでも下るが、最後に分離した部位に至る。

## 【0048】

好ましい実施態様において、基材の表面は、基材の表面中にウェル、すなわち

くぼみを含むように修飾される。これは当該分野において一般に知られるように種々の技術を使用して実施し得る。この技術は、限定するものではないが、写真印刷、打抜技術、成形技術およびマイクロエッチング技術を含む。当業者に理解されるように、使用する技術は基材の組成および形状に依存する。第1の基材がアッセイ位置および個々のアレイの両方を含む場合、好ましい方法は、マイクロターパープレート中のアッセイウェルの底にビーズウェルを形成する成形技術を利用する。同様に、好ましい実施態様は、アレイ形式で各フィンガーがビーズウェルを含む「フィンガー」または突起を含む成形された第2の基材を利用する。

【0049】

好ましい実施態様において、部位またはウェルは互いに間隔をもって分離される。当業者に理解されるように、ビーズの間隔は、中心間の距離を算出することによって決定される。部位の間隔を変動させることによって高密度、中密度または低密度のアレイが形成される。高密度アレイは、約 $5 \sim 15 \mu\text{m}$ 未満分離した部位を有することによって特徴付けられる。中密度アレイは、約 $15 \sim 30 \mu\text{m}$ 分離した部位を有し、低密度アレイは $30 \mu\text{m}$ より大きく分離した部位を有する。一般に、部位は $100 \mu\text{m}$ 未満、好ましくは $50 \mu\text{m}$ 未満、最も好ましくは $15 \sim 20 \mu\text{m}$ 未満分離している。ウェルの間隔をあけることの利点は特に市販のスキヤナーを使用してアレイを分析できることにある。すなわち、スキヤナーの解像度は変動し、高いまたは低い解像度のスキヤナーでの検出を可能にするアレイを形成することができる。高密度アレイには高解像度のスキヤナー（ $< 5 \mu\text{m}$ ）を用いることができる。これらのスキヤナーは特性（すなわちビーズ）の間隔に近い（ $< 15 \mu\text{m}$ ）アレイを有効に分析する。より低解像度（ $> 5 \mu\text{m}$ ）のスキヤナーには、より大きなビーズ間隔（すなわち、 $> 10 \mu\text{m}$ ）を利用することができ、 $15 \sim 20 \mu\text{m}$ が好ましい。両方の場合において、限定するものではないがAXON instrumentsのGENEPiXソフトウェアパッケージまたは従来の蛍光顕微鏡スキヤニング装置とともに提供される他のもののような種々のソフトウェアパッケージを使用する。好ましい実施態様において、ソフトウェアは、ビーズを分解しシグナル強度情報を引き出すためにコントラストに基くかまたはその他の画像処理アルゴリズムを用いる（US 5,916,651

、181（2000年8月30日出願）およびPCT/US00/23830（2000年8月30日出願）（出典明示で援用する）も参照のこと）。

【0050】

上記の実施態様においては特性の間隔は機材上の部位の間隔を物理的に変化させることによって達成されるが、別の実施態様において、ビーズウェル中のビーズがアレイを形成する場合、生物活性因子を含むビーズ集団に、生物活性因子を含まないビーズ集団を添加することによって密度を調節する。すなわち、生物活性因子を有しない（いくつかの実施態様においては検出可能なシグナルまたは標識を有しない）ビーズ集団を、生物活性因子を含む少なくとも1つのビーズ集団に添加する。生物活性因子を欠いたビーズ、すなわち「ブランクビーズ」は生物活性因子を有するビーズの濃度を希釈する。基材上に適用または分布すると、これによって生物活性因子を有するビーズの間隔が増加する。すなわち、ブランクビーズが存在しないと生物活性因子を有するビーズは1ウェル当たりビーズ1個以下の平均密度で基材上の実質的に全てのウェルを満たす。ウェルの間隔が近接している場合、高解像度スキャナーのみがアレイを有効に分析する。しかし、ブランクビーズ集団を添加すると、ブランクビーズは生物活性因子を有するビーズとともに分布し、それによって生物活性因子を有するビーズ間の距離が増加する。従って、好ましい実施態様において、生物活性因子を有するビーズの中心間の距離は少なくとも $5\mu\text{m}$ ；より好ましくは $10\sim 50\mu\text{m}$ ；最も好ましくは $15\sim 25\mu\text{m}$ である。

【0051】

1つの実施態様において、生物活性因子を有するビーズとブランクビーズとの間の比率を、アレイ上の生物活性因子を有するビーズの適正な密度を達成するように調整する。比率は所望されるビーズの間隔に依存する。すなわち、生物活性因子を有するビーズをビーズ $n$ 個分離れるようにすることが所望される場合、生物活性因子を有するビーズのブランクビーズに対する比率は $n^2$ である。すなわち、生物活性因子を有するビーズをブランクビーズ6個分分離させることが所望される場合、生物活性因子を有するビーズのブランクビーズに対する比率は $1:6^2$ または $1:36$ である。いくつかの実施態様においては少数のブランクビー

ズを含めることのみが必要である（すなわち、比率が約10：1以上である）かもしれないが、好ましい実施態様においては、比率は少なくとも1：36以上、特に好ましくは1：100である。

【0052】

別の実施態様において、アレイは第1の生物活性因子を有する第1のビーズ集団および第2の生物活性因子の集団を有する第2のビーズ集団を含む。従来のスキナーを使用できるようにアレイ上のビーズの間隔を調節する場合、この実施態様において各ビーズ集団について異なるタグで標識するかまたはタグ付加することが有用である。タグは好ましくは異なるチャンネルにおいて検出可能である。一度に1つのビーズ集団のみが分析される。従って、分析されないビーズはスパーサービーズとして作用するが、それらは生物活性因子を含み、異なるチャンネルにおいて分析することができる。各集団由来のビーズの間隔は分析のために適切にあげられ、分析すべきビーズの数はブランクビーズを使用する上記のアッセイに比較して増加する。すなわち、第1のチャンネル（これは第2のビーズ集団を検出しない）において第1のビーズ集団を分析する場合、第2のビーズ集団はスパーシングビーズまたはブランクビーズとして作用する。第2のビーズ集団は第1のビーズ集団の間隔を増加させるように作用する。次に第2のチャンネルにおいて第2のビーズ集団を分析する場合、第1のビーズ集団は、第2のビーズ集団を分離するスパーシングまたは「ブランク」ビーズとして作用する。

【0053】

従って、本発明は、上記のようなアレイおよび検出器も含む。好ましい実施態様において、アレイは検出器中に存在する。特に好ましい実施態様において、基材は顕微鏡スライドであり、光ファイバーバンドルはアレイ位置およびアッセイ位置を形成し、このアレイは検出器中に存在する。

【0054】

好ましい実施態様において、基材の表面において物理的変化を作製して、部位を生じさせる。好ましい実施態様において、例えば第2の基材が光ファイバーバンドルである場合、0.8／818，199および0.9／151，877（出典明示で援用する）に一般的に記載されるように、基材の表面はファイバーバンドル

の末端である。この実施態様において、個々のファイバーを含む光ファイバーバンドルの末端または遠位端においてウェルを作製する。この実施態様において、小さなウェルまたはくぼみがファイバーの一方の末端において形成されるように、被覆に関して、個々のファイバーのコアをエッチングする。必要なウェルの深さはウェルに添加しようとするビーズのサイズに依存する。

【0055】

この実施態様において一般に、ミクロスフェアはウェルに非共有的に会合しているが、以下で一般的に記載するように、ウェルをさらに化学的に官能基付与してもよく、架橋剤を使用してもよく、または物理的障害、すなわちビーズをおおうフィルムまたはメンブレンを使用してもよい。

【0056】

好ましい実施態様において、本発明のミクロスフェアを基材上の分離した部位または位置に結合（共有または非共有のいずれか）させるために使用できる修飾部位、特に化学的修飾部位を含むように基材の表面を修飾する。この関連での「化学的修飾部位」は、限定するものではないが、以下を含む：一般に対応する反応性官能基もまた含む、ミクロスフェアを共有結合させるために使用できる化学官能基（アミノ基、カルボキシ基、オキソ基およびチオール基を含む）のパターンの付加；ミクロスフェアを結合させるために使用できる接着剤のパターンの付加（接着剤の付加のための従来の化学官能基付与または接着剤の直接的付加による）；ミクロスフェアの静電結合のための（すなわち、ミクロスフェアが部位と反対の荷電基を含む場合）荷電基（化学官能基に類似）のパターンの付加；部位を差次的に疎水性または親水性にする化学官能基のパターンの付加（その結果、同様に疎水性または親水性のミクロスフェアを適切な実験条件下で添加するとミクロスフェアがハイドロアフィニティに基いて部位に会合する）。例えば、水系系中で疎水性部位を疎水性ビーズとともに使用すると、ビーズは優先的に部位に会合させられる。

【0057】

さらに、生物学的に修飾した部位を使用してビーズを基材に結合させてもよい。例えば、本明細書に一般的に記載するような結合リガンド対を使用してもよい。

；一方のパートナーはビーズ上に存在し、他方は基材上に存在する。この実施態様において特に好ましいのは、相補的核酸鎖および抗原／抗体対である。

【0058】

さらに、この方法での生物学的部分の使用は、複合アレイの作製も可能する。これは、基材10を欠く以外は図1Fに記載のシステムに類似している。この実施態様において、ビーズの集団は単一の結合パートナーを含み、この集団の亜集団は異なる生物学的因子を有する。異なる結合パートナーを有する異なる集団および空間的に分離した結合パートナーを有する異なるアッセイもしくはアレイ位置を含む基材を使用することによって、複合アレイを生成することができる。複合アレイの各々の分離したアレイが同じコードを使用し得るので、この実施態様はまた以下で一般的に記載するコードの再使用である。

【0059】

上記のように、この意味での「パターン」は、ビーズの分離した部位への結合を可能にする均質な表面処理、ならびに分離した部位を生じる表面処理の使用を包含する。当業者に理解されるように、これは種々の方法によって達成され得る。

【0060】

上記のように、本発明のアレイおよび特に1成分システムのアレイは、基材の表面を、分離した部位またはウェルを含むように変化させることによって形成される。好ましくは、本明細書に記載のように、ウェルは、1個以下のマイクロスフェアを含むように形成される。本明細書に記載のように、1成分システムにおいて、好ましい実施態様において、アッセイ位置（これは1成分システムにおいてアレイ位置も形成する）は光ファイバーバンドルである。別の実施態様において、本発明はアレイ上の少なくとも1つの分離した部位に光ファイバーバンドルのセグメントを含むアレイの改善した作製方法を提供する。

【0061】

一般に、この実施態様において、少なくとも1つの、しかし一般的には複数の光ファイバーバンドルを平面基材に結合させるかまたは挿入して平面基材上のアレイのアレイを形成させる。光ファイバーバンドルを基材に結合させる場合、方

法は長さLの光ファイバーバンドルを提供すること（ここでLは理論的にはいずれものの長さであり得る）、およびバンドルを、限定するものではないがダイヤモンドソーまたはウォータージェットの使用のような当該分野において公知の方法によって切断して複数の小さな光ファイバーバンドルセグメントを形成させることを包含する。次いでセグメントを、限定するものではないが、接着剤で結合したバンドルセグメントを収容する大きさの事前に形成されたウェル中にセグメントを配置すること、または光ファイバーバンドルが基材中に包埋されるように基材を融解することを包含する方法によってアレイに結合させる。

【0062】

別の実施態様において、方法は、少なくとも1つの光ファイバーバンドルを基材材料（例えばプラスチックまたはセラミック）のブロックに挿入すること、次いでバンドルを含む基材を所望の厚さに切断することを包含する（図13参照）。ファイバーバンドルの断面部分は基材材料によって縁どられる。一般に、少なくとも第1および第2のバンドルが基材材料に挿入される。一般に、バンドルは、本明細書に記載のようにアレイ形式である。当業者に理解されるように、この方法は多数の均質なアレイのアレイの生産を著しく容易にする。すなわち、理論的には、ファイバーバンドルの長さまたは厚さに上限はない。非常に長いバンドルを非常に厚い基材ブロック（すなわち、1メートルまでまたはより厚い）に挿入することができる。例えば、アレイの基材の代表的な厚さが約0.5cm未満であると考えれば、1mのブロック（1mのバンドルを挿入可能）によって少なくとも約200個の均質なアレイのアレイが形成される。

【0063】

該方法において、ファイバー束を基体中に、ブロック表面の水平面に対して実質的に垂直に挿入する。一般に、束を挿入されるオリフィスを作成するために、基体に穴を開けるかまたは機械加工する。いくつかの具体例において、オリフィスは束の周囲にあるシーラントまたはガスケットでライニングされる。別法では、ブロックを切断して複数の基体を形成させた後、シーラントまたはエポキシ樹脂を束の周囲の基体に塗布する。いくつかの具体例において、シーラントは束の周囲の基体からの幾分かのアッセイ溶液またはビーズの漏出を防ぎうるだけでな

く、シーラントは他の束から1の束を単離する束の周囲の境界を形成するので、このことは有益である。すなわち、いったんアレイが形成されると、少なくとも第1の光ファイバー束の周囲の基体の表面に物質をアプライし；物質は適所にファイバー束を固定するだけでなく、異なるファイバー束を分離する仕切りも形成する。いくつかの具体例において、物質、すなわち、エポキシ樹脂は仕切りを形成するのではなく、適所にファイバー束を保持する。

【0064】

別の具体例において、光ファイバー束を基体である物質の液体または溶融溶液中に置く。すなわち、該具体例において、基体は溶融可能な材料、例えば、限定するものではないが、プラスチックまたはワックスから形成される。好ましい具体例において、基体は熱硬化性または熱可塑性ポリマーから形成される。1の具体例において、少なくとも1個の光ファイバー束をホルダーによって一端に保持し、溶融した基体溶液中に浸漬する。

【0065】

溶融した基体の使用は、アレイの基体の形成においていくらか有用である。一度堅くなった基体中に組み込まれるであろう溶融溶液に物質を加えることができることが特に有益である。すなわち、物質を加えて、基体を反射性または不透明にするなどの基体の特性を修飾することができる。特に好ましい具体例において、カーボンブラックを液体基体物質に加える。カーボンブラックの添加は、得られる基体を不透明にする。

【0066】

容器はいずれの形状をとってもよく、加熱メカニズムは種々の様式で実行され得ることが理解される。しかしながら、束のアレイの少なくとも仮のホルダーから突き出ている部分が浸漬または浸水されうる溶融した基体の浴槽を作成および保持することが容器および加熱メカニズムの機能である。好ましい具体例において、容器は顕微鏡スライドと同じ寸法であり、その結果、得られる基体は顕微鏡スライドと同じサイズである。

【0067】

溶融した基体は、個々の束間の空間を埋めるであろう。熱源を切り、基体を硬



化させ、仮のホルダーを除去する。束の長さ $L$ の少なくとも何分の一でも、束を基体内に埋め込む。次いで、基体を上記のように切断して、ファイバー束を含有する複数の基体を形成させる。

【0068】

いくつかの具体例において、束の露出した末端を、典型的にはラッピングおよび磨くことによって機械加工または加工処理して、末端表面を平面化(planarize)する。本明細書に記載のように、凹状ウェル領域を各ストランドの曝露された末端の表面に形成させてもよく、ビーズが各ウェルまたは実質的な数のウェル中に沈殿する。

【0069】

凝固した基体によって個々の束が互いにきっちりした位置合わせにおいて保持されることに注目する。各束の縦軸は、実質的に互いに平行なままであり、基体の上表面の平面に対して実質的に垂直なままであろう。

【0070】

1の具体例において、基体の利点は、必要に応じて個々の束を除去および置き換えることができることである。例えば、1以上の束が損傷するかもしれない。アレイ全体を捨てるよりもむしろ、ワックスのような溶融可能な基体を用いる場合、損傷した束の周囲の基体を加熱することによって当該束を除去することができる。例えば、その内径が除去すべき束の外径 $D$ を上回る薄い壁の中空管を加熱し、ワックスプローブ中を押し進め、当該束の周囲に置くことができる。この局所的な加熱は損傷した束を除去し、新しいまたは異なる束で置き換えることを可能にし、次いで、その周囲に溶融したワックスを挿入して基体内に置換した束を保持することができる。

【0071】

好ましい具体例において、本発明はまた基体ホルダーを包含する。基体ホルダーはその中に基体を据える装置である。ホルダーはアレイの容易な取り扱いを可能にする。さらに、ホルダーは剛性を提供し、基体／アレイのゆがみを防ぐ。ホルダーはいずれの剛体物質からも形成できるが、好ましい具体例においてホルダーは金属である。

## 【0072】

好ましい具体例において、ホルダーは、基体の各エッジの周囲にある金属枠組、すなわち、顕微鏡スライドアレイを含む。いくつかの具体例において、ホルダーは、ふたの開閉を可能にするための蝶番を包含していてもよいふたを含む。蝶番式のふた自体は、ホルダーからのアレイの挿入および除去を容易にする。ふたはいずれの材料からも作成できるが、アレイからのシグナルの検出を可能にする半透明材料が好ましい。

## 【0073】

別の具体例において、ホルダーはさらに、枠組を結合させるベースを含む。ベースはいずれの剛体材料であってもよいが、好ましい具体例においてそれは半透明である。別法では、ベースは金属である。重要なことには、ホルダーは剛性のままであり、基体がゆがむのを防ぐ。

## 【0074】

当業者に明らかなように、一般に図面に示すように、いくつかの可能な配置の系がある。本明細書に記載の標準的な形式のほかに、種々の他の形式を使用してもよい。例えば、図1C-1Fに示すように、基体の「ピース」を使用してもよく、それは互いに連結していない。さらに、これらは、同じアレイであっても異なるアレイであってもよい。これらのピースを個々に作成してもよく、またはそれらを単一基体上の巨大な単位として作成し、次いで、基体を異なる個々の基体に切断または分離してもよい。したがって、例えば、図1Cおよび1Dは、第2の基体のウェルに加えられる複数のビーズアレイを示し；図1Cは、混合を最大化するために形成される「ビーズのビーズ」である。図1Dは、複数の二次元の第1の基体を使用し；当業者に明らかなように、これらは第2の基体に結合していてもしていなくてもよい。1の具体例において、特別の結合手段を用いず；別法では、種々の結合技術を用いる。例えば、基体へのビーズの結合に関して概説されるように、接着、化学、疎水性／親水性相互作用などを包含する共有または非共有結合力を用いてもよい。さらに、基体は磁性であってもよく、また、適所に（および混合してもよい）磁性的に保持されうる。したがって、例えば、図1Fに示されるように、結合部分を使用でき；これらは共有結合または非共有結合

であることができる。それらは単に結合のために使用してもよく、または第1の基体アレイを第2の基体の特定の位置に向けるために使用してもよい。したがって、例えば、異なるオリゴヌクレオチドを用いて、第1の基体を第2の基体に向け、結合させてもよい。

【0075】

好ましい具体例において、画像化のために使用される基体中に確立された光学的特性が存在する。したがって、例えば、「映像に撮る (lensing)」能力は、1成分または2成分系のいずれかにおける基体中に確立されてもよい。例えば、1成分系において、1以上のアッセイ位置の底面は独特または特別の光学成分、例えば、レンズ、フィルター等を有していてもよい。

【0076】

さらに、好ましい具体例は、アッセイ反応の混合を容易にする配置を利用する。例えば、好ましい具体例は、混合を可能にする2成分系を利用する。すなわち、いくつかの具体例において、アレイはブロックから突出し、アッセイ成分の良好な混合、反応速度の増加などを促進するために反応物を攪拌する「スティック」として使用できる。当業者に明らかなように、これは、種々の方法で達成される。好ましい具体例において、第1および第2の基体を、それらが互いにX-Y座表面、X-Z座表面、Y-Z座表面または3次元(X-Y-Z)のいずれかにおいて相対的に移動できるように配置する。好ましい具体例は、ブロックをプレートの平面またはそれに直交する面のいずれかにおいて自由に移動させるブロックジグを利用する。これは特に、反応容量が小さい場合に、標準的な混合条件はしばしばこれらの状況下でよく機能しないので、有用である。

【0077】

このほか、またはその代わり、系の一部としての付加的な混合成分が存在し得る。例えば、加えられた外来性混合粒子が存在していてもよく；例えば、1の具体例は、混合を強いるために移動させる磁石と共に磁性粒子を利用し；例えば、小さい磁石混合棒および磁石攪拌プレートを用いてもよい。

【0078】

別法では、1または2成分系のいずれかにおける混合は、系をシールし、標準

的な技術を用いて、所望により混合粒子を用いて、それを振盪することによって達成できる。

【0079】

好ましい具体例において、系は蒸発を減らし、小さい試料サイズおよび取り扱いを容易にするように配置する。すなわち、所定の空間を封じることによって系を閉じるかまたはシールして、少量の試料の調節を維持する。この点に関して、本発明は、アレイおよび／または試料を含むかまたは封入するハイブリダイゼーションチャンバーを提供する。より詳細に下記するように、好ましい具体例は、2成分系において特に有用であるが、1成分系においても有用であるベースプレートおよびアラインメント部分を含むハイブリダイゼーションチャンバーを利用する。

【0080】

封入した系の1の利点は、振動を減少または低下させることである。すなわち、少量の試料なので、アレイは、例えば、台振盪、モーター振盪または空気循環による振動によって引き起こされる乱れに影響されやすい。アレイを封入すること、およびアレイをベースプレート上に置くことによって、ベースプレートが振動を低下させるので、試料およびアレイは振動によって引き起こされる乱れにあまり影響されなくなる。

【0081】

本発明の該態様の付加的な利点は、封入したアレイが益々少量の使用を可能にすることである。開いたアレイ形式において、少量の試料は蒸発して、試料の変形、溶液中の溶質濃度の変化および不一致を包含する種々の問題を引き起こしうる。例えば、少量の試料が異なるアッセイ位置に存在する場合、溶液の特異な蒸発により、著しく変化した溶質濃度がもたらされ得る。かかる差異は、ハイブリダイゼーション速度を変化し、例えば、かかる開いたアレイから得られる結果を解釈および比較することが困難になる。しかしながら、例えば、本明細書に概説されるハイブリダイゼーションチャンバーにおいて、アレイを封入することにより、かかる試料変量を最小限にし、それにより、封入したアレイから得られるデータをより信頼できるものとする。したがって、本明細書に記載の方法のいずれ

も、ハイブリダイゼーションチャンバーと共に用いて有用である。

【0082】

また、封入したアレイは、開いたアレイにおけるインキュベーション時間と比べて延長したアッセイ／インキュベーション時間を可能にする。さらに、シールまたは封入したアレイは試料の蒸発を防ぎ、延長したインキュベーション期間を可能にする。

【0083】

さらに、封入したアレイは必要ならば、試料の混合を促進する。一般に、少量の試料を用いる場合、試料の十分な混合を達成することは困難である。しかしながら、より詳細に下記するように、1の具体例において、ハイブリダイゼーションチャンバーは、柔軟な膜を真空および／または加圧を提供する空気式装置と共に使用する場合、混合を促進する。

【0084】

「2成分」系を用いる場合、ハイブリダイゼーションチャンバーを用いてもよい。すなわち、成分のどちらも、すなわち、複数のアッセイ位置を含む基体および複数のアレイ位置を含む基体をハイブリダイゼーションチャンバー内に封入する。好ましい具体例において、これらの成分は限定するものではないが、ハイブリダイゼーションチャンバー中に封入されている光ファイバーアレイおよびマルチウェルマイクロタイタープレートを含む。

【0085】

好ましい具体例において、ハイブリダイゼーションチャンバーは、その上またはその中に成分の1つが置かれているベースプレートを含む。「ベースプレート」なる語により、その上にアレイ成分の1つが置かれているいずれかの台またはホルダーを意味する。ベースプレートは、プラスチック、ガラスまたは金属あるいは基体に関して本明細書中に記載されたいずれかの材料を含むいずれかの材料より作成されうる。ベースプレートが金属である場合、好ましくはアルミニウムにより作成される。アルミニウムは、軽量で、さらに耐久性のあるベースプレートを提供する。さらに、アルミニウムは、チャンバーに対して効率のよいおよび／または迅速な熱移動を可能とする。しかしながら、ベースプレートが

プラスチックまたはガラスにより作成される場合、成分は直接、ベースプレートと接触する。別法では、金属薄板または鋳型をベースプレート中に挿入するか、またはベースプレート上に置いてよい。金属薄板または鋳型は、種々の成分サイズおよび／または形状を適応させるために、種々の形状のいずれかを保持するように設計することができる。以前に記載されたように、金属は迅速で効率のよい熱伝導体であるという利点を提供する。

【0086】

1の具体例において、ベースプレートは、その中にアレイ成分が置かれる少なくとも1つの陥没またはベースキャビティー (base cavity) を含有する。すなわち、マイクロタイタープレートが成分である場合、例えば、陥没またはベースキャビティーは、マイクロタイタープレートが直接その中に置かれ、好ましくは、余分な振動を避け、有効な熱移動を可能にするためにぴったりと嵌るように形成される。陥没はベースプレート中に成形してもよい。さらに、ベースプレートは複数の陥没またはキャビティーを含有していてもよく、その結果、複数の分離したアレイ成分が単一のベースプレート上に置かれる。別法では、ベースプレートは平面であってもよく、好ましくは、アレイを適所に維持するためにフックまたは他の結合部分を含む。

【0087】

さらに好ましい具体例において、ハイブリダイゼーションチャンバーと共にふたを利用する。ふたはいずれの材料からも作成できるが（また、本明細書中の基体に関して列挙したとおり）、ガラス、プラスチックまたは金属が好ましい。ふたは好ましくは、ふたがベースプレート上に置かれる場合、閉じたチャンバーが形成されるようにベースプレートに適合している。

【0088】

別の具体例において、ふたは、少なくとも1つの成分配置ポートを含む。「成分配置ポート」なる語により、それに対して成分が固定されるふた中の部位を意味する。すなわち、配置ポートは成分の1つをふたへ結合させる。好ましい具体例において、ポートは、それにより成分が挿入されるふた中の穴である。例えば、光ファイバー束が成分である場合、ポートを介して束を挿入する。該具体例に

において、ポートは付加的に、結合部位の周囲のシーラントを含み、その結果、成分、すなわち、光ファイバー束の遠位末端とふたの間に気密なシールが形成される。該シーラントは、下記するように、シリコン、ゴム、プラスチックなどを包含するいずれの材料であってもよい。別法では、シールは石油ゼリーのようなゲルベースの物質、またはPARAFILMのようなフィルムベースの物質であってもよい。

【0089】

付加的な具体例において、ふたは、ふた中の複数のポートを含む。すなわち、複数の成分が使用される場合、各成分につき別々のポートが必要である。例えば、複数の光ファイバー束を使用する場合、各光ファイバー束を別々のポートに置く。しかしながら、各光ファイバー束を1のポート中に一度に挿入することが可能であるが、同じ光ファイバー束を異なるポート中に連続的に挿入することも可能である。すなわち、成分を連続的に挿入するポートの数に限りはない。例えば、図7Aに示されるように、ふた10は、その中に光ファイバー束30を置く複数のポート20を含有する。次いで、ふたをベースプレート60のベースキャビティー50中のマイクロタイタープレート40上に置く。ベースプレート60は図7bに示され、ベースプレート60およびベースキャビティー50を示す。

【0090】

好ましい具体例において、ポートシールは溶液の汚染を減少または防ぐ。すなわち、個々のポート／成分の周囲のシールは、ベースプレートまたはアレイ成分に対してシールを形成し、その結果、特定のポート／成分に対応する試料由来の溶液が他の成分から分離またはシールされる。

【0091】

別の具体例において、全てのポートがいつも成分でも満たされているわけではない。ポートの最大充填量未満が適当または所望される場合、プラグを成分を含有しないポート中に挿入することができる。この方法において、成分を含有しないポートの存在にもかかわらず、ふたは依然としてベースプレートと気密なシールを形成する。プラグはゴム製ストッパー、ガスケット、フィルム、ゲルなどの形態であることができる。

## 【0092】

好ましい具体例において、ふたとベースプレートとの間のチャンバーの周囲にシーラントが存在する。シーラントは、ふたとベースプレートとの間に形成される気密なシールをもたらすいずれの材料であってもよい。好ましい具体例において、シーラントはゴム、例えば、ゴムまたはシリコーンガスケットまたはオーリング80により形成される（図8参照）。シーラントは、ふたまたはベースプレートのいずれに固定されてもよい。このため、シーラントはふたまたはベースプレートに永久に貼付されていてもよい。別法では、シーラントはふたまたはベースプレートのいずれかにおける溝中に嵌っていてもよい。それにより、シーラントはふたまたはベースプレートに固定されるが、固定化は必ずしも永久ではない。別法では、シーラントは、石油ゼリーのような液体シーラントから、またはPARAFILMのような柔軟なフィルム材料または他のワックスから形成される。

## 【0093】

好ましい具体例において、2成分系を用いる場合、ハイブリダイゼーションチャンバーはさらにアラインメント部分を含む。「アラインメント部分」なる語により、ふたとベースプレートとのアラインメントを促進するチャンバーの特徴を意味する。アラインメント部分の重要性は単一のふたおよびベースプレートのアラインメントにあるだけでなく、複数のふたおよび基材プレートの再生可能なアラインメントにもある。すなわち、アラインメント部分は、いずれかのアレイ成分といずれかのマルチプルウェルマイクロタイタープレートの配置間の物理的アラインメントを促進する。ふたにおける光ファイバー束とベースプレート上のマイクロタイタープレートとを整列させる場合、アラインメント部分は、ファイバー束の垂直中心軸と対応するウェル中心軸とのアラインメントを可能にする。好ましい具体例において、全てのファイバー束がウェルの内壁を触れずに通り抜ける、すなわち、接触しないようなアラインメントである。該アラインメントは続いて起こる画像化に重要であり得る。

## 【0094】

1の具体例において、アラインメント部分は相補的な雄／雌型嵌合部（fittin



g) である。雄型嵌合部はふたまたはベースプレートに貼付されてもよいが、永久に貼付される必要はない。雄型嵌合部がアラインメント部分としてベースプレートまたはチャンバーのふたのいずれかにおいて使用される場合、反対のチャンバーピースは雄型嵌合部が挿入される溝穴または穴（雌型嵌合部）を含有することが好ましい。通常の当業者には、本発明と共に用いて有用な雄／雌型嵌合部のバリエーションが明らかである。この点に関して、特徴は1のチャンバーピース上のインデクサー（indexer）ピンまたは出っ張りおよび他のピース上の穴または相補的な溝であってもよい。

【0095】

好ましい具体例において、基準を用いる；U. S. S. N. 60／119, 323および09／500, 555およびPCT／US00／03375を参照のこと（出典明示により全体として本明細書の一部とする）。

【0096】

別の具体例において、チャンバーはまた、ふたとベースプレートとの間の安全な接触を維持するためのクランプ特徴を含有していてもよい。クランプで締める利点は、チャンバー中の一様な負荷を妨害して一様なシール圧を達成することにある。「クランプ特徴」または「クランプ」なる語により、ふたとベースプレートとの間の増加した圧力またはシールの適用および維持を可能にするいずれかの特徴を意味する。1の具体例において、クランプ特徴は回転鉗／レセプタクル（receptacle）メカニズムを包含する。すなわち、鉗90をレセプタクル95中に挿入し、回転させてふたおよびベースプレートと一緒に押し下げる（図8参照）。別法では、該メカニズムは、フックおよび掛け金メカニズムを包含する。通常の当業者には、本発明と共に用いて有用ないくつかのクランプで締めるメカニズムが明らかである。さらに、通常の当業者には、クランプで締める方法が手動に限定されないことが明らかである。したがって、それは自動化されうる。

【0097】

別の具体例において、チャンバーはチャンバーを取り扱うための周囲の特徴を包含する。好ましい具体例において、該特徴は、使用者の指が手動でチャンバー／アレイを取り扱うことを可能にするのに十分に幅広な溝穴である。別の具体例

において、該特徴は溝穴、溝、ハンドルなどであり、チャンバーの自動またはロボット運転において特に有用である。これらの付加的な特徴はまた、ロボット操縦を容易にするために非対称に配置されうる。

【0098】

上記のように、ハイブリダイゼーションチャンバーの利点は、試料溶液を喪失することなく少量の試料を使用できることである。さらなる具体例において、チャンバーは、付加的な溶液を保持するための1以上の貯蔵器を含有しうる。それにより、ハイブリダイゼーションチャンバーはまた、湿気チャンバーとして機能する。付加的な溶液の貯蔵器中への包含はさらに試料の蒸発を防ぐ。

【0099】

別の具体例において、例えば、マイクロタイタープレートを用いない場合、試料をベースプレートの表面にある膜に加えてもよい。膜を用いることの利点には、各使用後の膜の浄化または処理の容易さがあり、柔軟な膜は、試料ウェルの底面とチップとの接触に起因してピペットチップまたは光ファイバーチップを損傷することはないであろう。

【0100】

該具体例において、ベースプレートは、例えば、マイクロプレート形式において、一連の小さな開口部105を含有する(図9A参照)。したがって、膜は分離したアッセイ位置を形成している開口部中に押し下げられる。種々の膜が本発明で有用である。重要なことは、膜が柔軟であることである。いくつかの具体例において、化学的に不活性な膜を有することが望ましいが、いくつかの具体例において、アッセイ成分が相互作用する膜、例えば、ナイロン、ニトロセルロース膜などを有することが望ましい。

【0101】

好ましい具体例において、チャンネルは開口部の各々に連結している(図9B)。チャンネル100は真空および/または圧力を生じる空気式装置に連結してもよい。したがって、真空が適用される場合、膜は開口部105中に変形して小さいポケットまたはウェルを形成する。次いで、試料をポケットに加えることができる。異なる量の真空を開口部を通じて膜に適用することにより、変形した膜

によって形成されるウェルの容積および流体高度を変化することができる。さらにまた、断続する真空をチャンネルを通じて膜に適用することにより、ウェル中の液体を攪拌または混合することができる。かかる混合法は、系全体を振動する必要がなく、攪拌バーまたはタンブラーが必要ないので有益である。さらに、開口部のサブセットを異なるチャンネルに連結し、異なるサブセットを同じベースプレートにおいて独立して混合することができる。

【0102】

正圧を加える場合、圧力の大きさ、膜の上面における負荷の有無ならびに開口部のサイズおよび形状に依存して、膜は上に変形するか、または平面に止まる。このことは、チャンバーの洗浄または浄化において特に有意な利点を有する。

【0103】

圧力および真空をある特定の順序で異なるポートに加える場合、少量の溶液を膜の異なる部分に移動させることができる。すなわち、図10A-Fに示されるように、圧力および真空の異なる適用により、いくつかの場所で持ち上げられ、他の場所で押し下げられる膜を生じる。したがって、膜に加えられる溶液は膜のより低いセクションに移動するであろう。これは、膜上での試料のインキュベーションを正確な時間進行させるという利点を有する。これは、特定の時間後、真空を解除し、もし必要ならば、溶液を除去するように圧力を加えることができる。これは、小さいセクションにおけるインキュベーションがアレイを横切って第1と最後のウェルとの間の一様なインキュベーション時間を達成することを可能とするであろう。

【0104】

真空または圧力の適用によって試料容量を調節する利点は、ハイブリダイゼーション溶液のような試薬の消費量の減少；少量試料の混合の容易さの増強および膜の浄化の容易さの増強を包含する。

【0105】

好ましい具体例において、チャンネルは共通の流体ハンドリング装置に連結して、ハイブリダイゼーション混合物のような試料溶液または洗浄液をポンプで汲み上げるかまたは吸い上げる。さらに、1の具体例において、全ての開口部を単

一のチャンネルに連結する。それにより、全てのウェルを同じ溶液で処理する。別法では、開口部のサブ集団を異なるチャンネルに連結し、サブ集団への溶液の特異な適用を可能にする。

【0106】

チャンネルを流体ハンドリング装置に連結する場合、試料由来の液体の適用および除去のための特徴を包含しなければならないであろう。すなわち、ベースプレート中の開口部を通じて加えられ、除去されるべき液体について、流体を移動させるために膜は浸透性でなければならない。この点に関して、例えば、針は、流体を適用および除去するために膜を貫くのに有用である。針を使用する場合、再度のシールが可能な膜を使用すること、または溶液の望ましくない漏出を防ぐために穿刺箇所シーラントを適用することが必要かもしれない。

【0107】

いくつかの具体例において、チャンバーは熱移動特徴を包含する。すなわち、高温が必要または所望される場合、チャンバーは、高温を維持するように設計される。1の具体例において、これはチャンバーへの断熱材の適用を包含する。次いで、予め温めた溶液をチャンバー中に導入する場合、高温が維持される。すなわち、溶液は、チャンバー中にポンプで汲み上げられる前に、チャンバーの外側で容易に加熱できる。単純なチャンバージオメトリーは、異なるウェル中の液体間での等温の維持を容易にするであろう。

【0108】

別の具体例において、チャンバーは、チャンバー中で高温を維持するための加熱メカニズムを包含する。1の具体例において、加熱装置によってチャンバーを均一に加熱する。別の具体例において、加熱装置はチャンバーの異なるセクションを独立して加熱する。

【0109】

上記のように、金属は熱の高速で効率のよい伝導体なので、ベースプレート上のアルミニウムのような金属の使用は熱移動を促進する。

【0110】

「1成分」系を使用する場合、ふたおよびシーリングメカニズムを用いること

ができる。すなわち、上記のように、ふたはベースプレートと気密なシールを形成する。したがって、上記のふたのように、「1成分」系のふたも、ふたとベースプレートとの間にシーラントを含む。1の具体例において、ふたとベースプレートはまた、「2成分」系に関して上記されるようなアラインメント部分を含む。別法では、1の具体例において、1成分系のチャンバーはアラインメント部分を含まない。これに関して、ふたおよびベースプレートの1成分系におけるストリンジエントなアラインメントの必然性は2成分系におけるよりも低い。すなわち、1成分系はベースプレート上のアレイ位置と共に整列されるべきふたにおけるアレイ成分を有さないので、アラインメントはストリンジエントではない。しかしながら、アラインメントは依然として画像化に重要である。

#### 【0111】

さらに、上記のように、1成分系におけるチャンバーのふたはガラス、プラスチックまたは金属で作成できる。さらに、金属は高速で効率のよい熱伝導体であるので、金属の使用は、温度の維持を容易にする。

#### 【0112】

加えて、系は同様に付加的な元素を含みうる。これらはプローブまたは光ファイバー束に関するホルダーまたはホルダー（複数）を含む。このようなホルダーは1999年5月20日に出願されたU. S. S. N 60/135, 089および2000年5月19日に出願された09/574, 962ならびに2000年5月19日に出願されたPCT US 00/13772により完全に記載されている。加えて、系はU. S. S. N. s 09/033, 462および09/260, 963ならびにPCT/US 99/04473に記載のように細胞を含んでもよい。加えて、系はU. S. S. N. s 60/119, 323および09/500, 555ならびにPCT/US 00/03375に記載のように起線を含んでもよく、こらら全ての刊行物は出典明示し本明細書に組み入れる。

好ましい具体例において、本発明の方法および組成物はロボット系を含む。多くの系は、当業者に明らかであるように、一般に96（またはそれ以上）のウェルマイクロタイタープレートの使用に関するが、多くの異なるプレートまたは構造を使用することができる。加えて、本発明記載のいずれかのまたは全ての工程

は自動化されていてもよく；したがって、例えば系は完全または部分的に自動化されていてもよい。

【0113】

当業者に明らかなように、使用できる多くの構成要素があり、限定するものではないが、1つまたはそれ以上のロボットアーム；マイクロプレートの位置決めのためのプレートハンドル；非交差汚染プレート上のウェルのふたを除去および交換するための自動ふたハンドル；使い捨てチップを有する試料分布に関するチップアセンブリ；試料分布に関する洗浄可能チップアセンブリ；96ウェル装填ブロック；冷却試薬棚；マイクロタイタープレートピペット位置（冷却されていてもよい）；プレートおよびチップに関するスタッキングタワー；およびコンピュータ系を含む。

完全なロボット系はスクリーニング適用の全ての工程を行うための高処理能力ピペッティングを含む自動液体—および粒子—ハンディングを含む。これは液体および粒子操作、例えば吸引、分配、混合、希釈、洗浄、正確な容量移動；ピペットチップの回収および破棄；および単試料吸引から多く誘導される同一の容量の反復ピペッティングを含む。これらの操作は交差汚染物質自由液体および粒子移動である。

【0114】

好ましい具体例において、化学誘導粒子、プレート、チューブ、磁気粒子、またはリガンドまたは変異胃蛋白に対して特異性を有する他の固相マトリックスが使用される。マイクロプレート、チューブまたはいずれの固相マトリックスの結合表面は非極性表面、高極性表面、共有結合を促進させる修飾デキストランコーティング、抗体コーティング、融合蛋白またはペプチドを結合させる結合性媒体、表面固定蛋白、例えば組み換え蛋白AまたはG、ヌクレオチド樹脂またはコーティングを含み、他の結合性マトリックスは本発明において有用である。

好ましい具体例において、マルチウェルプレート用の基盤、マルチチューブ、小型のチューブ、深いウェルプレート、マイクロフュージ（microfuge）、低温バイアル、四角ウェルプレート、フィルター、チップ、光ファイバー、ビーズおよび種々の容量を有する他の固相マトリックスまたは基盤は、付加的な能力のた

めに機能向上できるモジュラー基盤上に適応する。このモジュラー基盤は可変速度環状シェーカーおよび源試料に関する多位作用デッキ、試料および試薬希釈、分析プレート、試料および試薬貯蔵所、ピペットチップ、および活性洗浄ステーションを含む。

好ましい具体例において、熱循環および熱調節系は熱交換器、例えば制御ブロックまたは基盤の温度を安定させるため使用され、4～100℃でインキュベートする試料の正確な温度制御を提供する。

#### 【0115】

好ましい具体例において、単または多磁気プローブ、結合性プローブを有する相互交換できるピペットヘッド（単または多チャンネル）またはピペットは液体および粒子をロボット操作する。マルチウェルまたはマルチチューブ磁気分離装置または基盤は担体を単または多試料フォーマットにおいて液体および粒子操作する。

いくつかの好ましい具体例において、計測器はデータを保存および変換し、定量化フォーマットにイメージするために、CCDカメラ；およびコンピュータワークステーションを含むだろう。これらはデータ解析できるだろう。

柔軟なハードウェアおよびソフトウェアは、様々な適用に適応する機器である。ソフトウェアプログラムモジュールは方法の創造、修飾および運転を行える。システム診断モジュールは、機器配列、適性接続およびモーター操作を行える。改造された器具、実験器具および液体ならびに粒子移動型は、異なる適用であり、実行することができる。データベースは方法およびパラメーター記憶装置である。ロボットおよびコンピュータインタフェースは機器間の通信を行う。

好ましい具体例において、ロボットワークステーションは、1つまたはそれ以上の加熱または冷却する構成部を含む。反応および試薬に応じて、冷却または過熱のいずれかが必要でありえ、これらはペルチェ系を含む多数の公知の加熱および冷却系を使用して行うことができる。

#### 【0116】

好ましい具体例において、ロボット機構は中央演算処理装置を含み、これはメモリと入力／出力デバイスの組（例えば、キーボード、マウス、モニタ、プリン

ター等)をバスで接続する。中央演算処理装置、メモリ、入力／出力デバイスおよびバスの間の一般的な相互作用は当該分野において公知のものである。したがって、行われる実験に依存する多種の異なる方法はCPUメモリに保存されている。

好ましい具体例において、本発明の組成物は、さらに、マイクロスフェアの母集団を含む。本明細書の「母集団」なる用語は、アレイに関する上記の概要のように複数のビーズを意味する。母集団が亜集団に分割される場合、1つのマイクロスフェアまたは多数の同一のマイクロスフェアであってもよい。いくつかの具体例において、これは、以下のより完全に概要されるように、アレイは各々の生物活性剤に対して1つのビーズだけを含んでいてもよく、好ましい具体例は複数の各々の型のビーズに有用である。

#### 【0117】

本明細書の「マイクロスフェア」または「ビーズ」または「粒子」または文法上同義語は小さい別個の粒子を意味する。ビーズの構成は、生物活性剤および合成法に応じて変化するだろう。適当なビーズ構成は、限定するものではないが、プラスチック、セラミック、ガラス、ポリスチレン、メチルスチレン、アクリル重合体、常磁性物質、トリアゾル、カーボングラファイト、二酸化チタニウム、ラテックスまたは架橋デキストランを含み、例えばセファロース、セルロース、ナイロン、架橋ミセルおよびテフロンが全て使用でき、ペプチド、核酸および有機基合成に使用されるものを含む。Bangs Laboratoriesの「マイクロスフェア検出ガイド (Microsphere Detection Guide)」は有用なガイドである。

ビーズは球形である必要はなく；不揃いの粒子を使用してもよい。加えて、ビーズは多孔性であってもよく、したがって、ビーズの表面積が増加し、生物活性剤付着またはIBL付着のいずれかに利用できる。ビーズ粒径の範囲は、ナノメートル、すなわち100nm～ミリメートル、すなわち1mmであり、約0.2ミクロン～約200ミクロンであるビーズが好ましく、約0.5～5ミクロンが特に好ましいが、いくつかの具体例において、より小さいビーズを使用してもよい。

本発明の主要な構成は、基材の表面の別個の部位でビーズの結合または付着を



可能にし、ビーズがアレイの経過の間動かないようにする基材／ビーズ組の使用であることが示されるべきである。

【0118】

いくつかの具体例において、各々のマイクロスフェアは生物活性剤を含むが、当業者に明らかなように、合成法に応じて生物活性剤を含まないいくつかのマイクロスフェアが存在してもよい。別法として、本明細書に記載のように、いくつかの具体例において、マイクロスフェアの母集団は生物活性剤を含まないことが望ましい。本明細書の「候補生物活性剤」または「生物活性剤」または「化学的機能」または「結合リガンド」は、本明細書に記載のいずれの分子、例えば、蛋白、オリゴペプチド、小さい有機分子、相関複合体、ポリサッカライド、ポリヌクレオチド等を意味し、これらは本発明のマイクロスフェアに付着できる。本発明の組成物は、1つの主要な使用を有することは理解できるだろう。好ましい具体例において、以下により完全に概要されるように、組成物は特別な標的検体の存在；例えば、特別なヌクレオチド配列または特別な蛋白、例えば酵素、抗体または抗原の存在または非存在を検出するために使用される。別の好ましい具体例において、組成物は、特別な標的検体に結合するための生物活性剤、すなわち薬物候補をスクリーンするために使用される。

【0119】

生物活性剤は、多数の化学物質群を含むが、典型的には、有機分子、好ましくは100ドルトンより大きく、約2500ドルトンより小さい分子量を有する小さい有機化合物を含む。生物活性剤は、蛋白、特に水素結合で構造的相互作用を必要とする官能基を含み、典型的には少なくとも1つのアミン、カルボニル、ヒドロキシルまたはカルボキシル基、好ましくは少なくとも2つの化学官能基を含む。生物活性剤は、しばしば、1つまたはそれ以上の上記官能基で置換されていてもよい環状炭素またはヘテロサイクリック構造および／または芳香族またはポリ芳香族構造を含む。また、生物活性剤は、ペプチド、核酸、サッカライド、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、その誘導体、構造アナログまたは組み合わせを含む生体分子で見出される。核酸および蛋白が特に好ましい。

生物活性剤は、合成または天然化合物のライブラリーを含む広範囲の源から得

ることができる。例えば、多くの方法はランダム化オリゴヌクレオチドの発現を含む種々の有機化合物および生体分子のランダムおよび直接合成のために利用できる。別法として、細菌、カビ、植物および動物抽出物の形態である天然化合物のライブラリーは入手できるか、または容易に生成される。加えて、天然または合成生成ライブラリーおよび化合物は、従来の化学的、物理的および生化学的方法により容易に修飾できる。公知の薬剤は直接またはランダム化学修飾、例えばアシル化、アルキル化、エステル化および／またはアミド化に付すことができ、構造アナログを生成することができる。

#### 【0120】

好ましい具体例において、生物活性剤は蛋白である。本明細書の「蛋白」は、少なくとも2つの共有結合したアミノ酸を意味し、これは蛋白、ポリペプチド、オリゴペプチドおよびペプチドを含む。この蛋白は天然に生じるアミノ酸およびペプチド結合または合成ペプチド模倣構造により生成することができる。したがって、本明細書で使用される「アミノ酸」または「ペプチド残基」は、天然に生じるおよび合成アミノ酸の両方を意味する。例えば、ホモフェニルアラニン、シトルリンおよびノルロイシンは、本発明の目的に関してアミノ酸と考えられる。側鎖は、(R)または(S)配置のどちらであってもよい。好ましい具体例において、アミノ酸は、(S)またはL-配置である。非天然に生じる側鎖が使用できる場合、非アミノ酸置換基が使用でき、例えばインビボで分解を防止するかまたは遅らせる。

好ましい具体例において、生物活性剤は、天然に生じる蛋白または天然に生じる蛋白のフラグメントである。したがって、例えば蛋白を含む細胞抽出物または蛋白様細胞抽出物のランダムもしくは直接消化物が使用できる。この点において、原核および真核蛋白のライブラリーは、本明細書に記載された系においてスクリーニングできる。特に好ましいこの具体例において、細菌、カビ、ウイルスおよび哺乳類の蛋白のライブラリーが好ましく、ヒト蛋白が特に好ましい。

好ましい具体例において、生物活性剤は約5～約30のアミノ酸からのペプチドであり、約5～約20のアミノ酸からのペプチドがより好ましく、約7～約15からのペプチドが特に好ましい。ペプチドは、上記のような天然に生じる蛋白

の消化物、ランダムペプチドまたは「偏った (biased)」ランダムペプチドであってもよい。本明細書の「ランダム化」または文法上同義語は、各々の核酸およびペプチドが各々本質的にランダムヌクレオチドおよびアミノ酸から成ることを意味する。一般にこれらのランダムペプチド（または以下に議論する核酸）が化学的に合成されるので、これらはいずれかの位置でいずれかのヌクレオチドまたはアミノ酸を含みうる。合成過程は、ランダム化蛋白または核酸を生じるように設計でき、配列の長さを超える全てまたはほとんどの可能な組み合わせが発生し、したがって、ランダム化生物活性蛋白様薬剤のライブラリーが形成される。

【0121】

好ましい具体例において、生物活性剤のライブラリーが使用される。ライブラリーは生物活性剤の十分に構造的に多様化した母集団を提供し、標的検体への結合の確率的に十分な範囲に効果がある。したがって、相互作用ライブラリーは、その各員の少なくとも1つが標的検体に対する結合性を与える構造を有するために十分に大きくなってはならない。相互作用ライブラリーの必要とされる絶対的な大きさを測定することは難しいが、自然が免疫応答で手掛かりを与えており： $10^7 \sim 10^8$ の異なる抗体の多様性は、十分な結合性で少なくとも1つの組み合わせを提供し、生物に面した最も可能性ある抗原に相互作用する。インビトロにおける公開された選択法もまた、 $10^7 \sim 10^8$ のライブラリーの大きさが標的の結合性を有する構造を見出すために十分であることを示している。したがって、好ましい具体例において、少なくとも $10^6$ 、好ましくは少なくとも $10^7$ 、より好ましくは少なくとも $10^8$ および最も好ましくは少なくとも $10^9$ の異なる生物活性剤は、対象法で同時に分析される。好ましい方法は、ライブラリーの大きさおよび多様性を最大にする。

好ましい具体例において、ライブラリーは完全にランダム化され、いずれかの位置で配列優先性または恒常性がない。好ましい具体例において、ライブラリーは偏っている。これは、配列のいくつかの位置が恒常性を保持しているか、または限られた数の可能性から選択される。例えば、好ましい具体例において、ヌクレオチドまたはアミノ酸残基は所定の群、例えば疎水性アミノ酸、親水性残基、架橋のためのシステイン、SH-3ドメインに関するプロリン、リン酸化部位に

関するセリン、トレオニン、チロシンまたはヒスチジン等の創製に、またはプリン等に立体的に偏った（小型または大型）残基の群内でランダム化される。

【0122】

好ましい具体例において、生物活性剤は核酸（本明細書において、一般に「プローブ核酸」または「候補プローブ」と称する）である。本明細書において、「核酸」または「オリゴヌクレオチド」または文法上同義語は、共に共有結合した少なくとも2つのヌクレオチドを意味する。本発明の核酸は、一般に、リン酸ジエステル結合を含むが、いくつかの場合、以下に示すように、例えばリン酸アミド（Beaucage, et al., Tetrahedron, 49(10):1925 (1993) およびそれらの引用文献； Letsinger, J. Org. Chem., 35:3800 (1970)； Sprinzlら Eur. J. Biochem., 81:579 (1977)； Letsingerら Nucl. Acids Res., 14:3487 (1986)； Sawaiら Chem. Lett., 805 (1984), Letsingerら J. Am. Chem. Soc., 110:4470 (1988)； および Pauwelsら Chemica Scripta, 26:141 (1986))、ホスホロチオエート（Magら Nucleic Acids Res., 19:1437 (1991)； および米国特許第5,644,048号）、ホスホロジチオエート（Briuら J. Am. Chem. Soc., 111:2321 (1989))、0-メチルホスホロアミド連結（Eckstein、オリゴヌクレオチドおよびアナログ： A Practical Approach, Oxford University Press参照）、およびペプチド核酸骨格および連結（Egholm, J. Am. Chem. Soc., 114:1895 (1992)； Meierら Chem. Int. Ed. Engl., 31:1008 (1992)； Nielsen, Nature, 365:566 (1993)； Carlssonら Nature, 380:207 (1996)参照、これらは出典明示により本明細書に組み入れる）を含む、別の骨格を有していてもよい核酸アナログが含まれる。他のアナログ核酸は、陽性骨格（Denpcyら Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:6097 (1995))； 非イオン性骨格（米国特許第5,386,023号； 第5,637,684号； 第5,602,240号； 第5,216,141号； および 第4,469,863号； Kiedrowshiら、Angew. Chem. Intl. Ed. English, 30:423 (1991)； Letsingerら J. Am. Chem. Soc., 110:4470 (1988)； Letsingerら、Nucleosides & Nucleotides, 13:1597 (1994)； 第2章および第3章、ASCシンポジウム・シリーズ580、「アンチセンスリサーチにおける炭水化物修飾」、Y.S. SanghuiおよびP. Dan Cook編； Mesmaekerら、Bioorganic & Medicinal Chem. Lett., 4:395 (1994)； Jeffsら、J. Biomolecular NMR,

34:17 (1994); Tetrahedron Lett., 37:743 (1996))および米国特許第 5,235,033号 および 第5,034,506号、ならびに第6章および第7章、A S Cシンポジウム・シリーズ580、「アンチセンスリサーチにおける炭水化物修飾」、Y.S. Sanghui および P. Dan Cook編に記載の非リボース骨格を有する核酸を含む。1つまたはそれ以上のカルボサイクリック糖を含む核酸もまた核酸の定義内に含まれる(Jenkinsら Chem. Soc. Rev., (1995) 169-176頁参照)。いくつかの核酸アナログはRawls, C & E News、1997年6月2日35頁に記載されている。全てのこれら引用文献は出典明示し本明細書に組み入れる。リボースーリン酸骨格においてこれらの修飾を行い、標識のような付加的な部の付加を容易にし、あるいは生理学的環境においてこのような分子の安定性および半減期を増加でき、例えばPNAが特に好ましい。加えて、天然に生じる核酸およびアナログの混合物を調製できる。別法として、異なる核酸アナログの混合物、および天然に生じる核酸およびアナログの混合物を調製できる。核酸は特記されていれば単ストランドまたは二重ストランドのいずれであってもよく、または二重ストランドまたは単ストランド両方の配列の部を含んでいてもよい。核酸はDNA、ゲノムおよびcDNAの両方、RNAまたはハイブリッドであってもよく；核酸はデオキシリボースおよびリボースヌクレオチドのいずれの組み合わせ、およびウラシル、アデニン、チミン、シトシン、グアニン、イノシン、キサントニン、ハイポキサントニン、イソシトシン、イソグアニンおよび塩基アナログ、例えばニトロピロールおよびニトロインドール等を含む、塩基のいずれの組み合わせを含んでいてもよい。

#### 【0123】

好ましい具体例において、生物活性剤は、DNAおよびRNAを含む、クローン核酸のライブラリーである。この具体例において、各々の核酸は、一般に慣用的方法（限定するものではないが、プラスミドまたはファージベクターにおける増殖、PCR等を含む増幅法を含む）を使用して調製される。核酸は、好ましくはいくつかのフォーマット、例えばマイクロタイタープレートフォーマット、およびライブラリーの付着のために添加されるビーズにアレイされる。

クローンライブラリー（または本明細書に記載のいずれかの核酸）の付着は、

当業者に明らかであるだろう種々の方法、限定するものではないが、化学的または結合性捕捉（例えば、AminoLinkまたはビオチン化ヌクレオチドのような誘導ヌクレオチドを含み、これらは表面に核酸を付着させるために使用され、ならびにハイブリダイゼーションによる結合性捕捉を含む）、架橋および静電結合等で行うことができる。

好ましい具体例において、結合性捕捉はビーズにクローン核酸を付着させるために使用される。例えば、クローン核酸を、例えば結合対の1員で誘導でき、およびビーズを結合対の他の員で誘導できる。適当な結合対は、本明細書に記載のIBL/DBL対である。例えばクローン核酸を、ビオチン化できる（例えば、ビオチンの光学活性化架橋連結により、ビオチン化ヌクレオチドの酵素の組み込みを使用して）。ついで、ビオチン化核酸を、当該分野で公知のように、ストレプトアビジンコート化ビーズに捕捉できる。同様に、例えばジゴキシゲニンおよび抗ジゴキシゲニン抗体のような他のハプテン-受容体組み合わせが使用できる。別法として、化学基は誘導体ヌクレオチドの形態に付加することができ、表面に核酸を付加するために使用される。

#### 【0124】

好ましい付着は共有結合であるが、各々の核酸あたりの複数の付着部位が存在する場合、相対的に弱い相互作用（例えば非共有結合）でさえも表面に核酸を付着させるために十分である。したがって、例えば、静電気相互作用は、例えば生物活性剤と反対の電荷を有するビーズを使用することにより付着できる。

同様に、ハイブリダイゼーションに利用する結合性捕捉は、ビーズにクローン核酸を付着させるために使用できる。例えば、当該分野で公知のように、ポリA+RNAは、日常的に、オリゴ-dTビーズへのハイブリダイゼーションにより捕捉でき、これはオリゴ-dT捕捉、ついで架橋工程、例えばソラレン架橋を含む。目的の核酸がポリA領域を含まない場合、当該分野で公知の末端転移酵素での重合により、またはオリゴAリンカーのライゲーションを介して付着できる。

別法として、化学架橋連結は、例えば当該分野で公知のように、チミジンの活性基への光活性架橋することにより行うことができる。

一般に、特別な方法がクローンアレイをデコードするために必要とされ、これ

は以下により完全に説明する。

【0125】

一般に蛋白に関して上記のように、核酸生物活性剤は、天然に生じる核酸、ランダム核酸、または「偏った」ランダム核酸であってもよい。例えば、蛋白に関して上で説明したように、原核生物または真核生物のゲノムの消化物を使用できる。

一般に、本発明のプローブは、標的配列（本明細書に記載のように、試料の標的検体配列または他のプローブ配列のいずれか）に対し相補的に設計され、標的と本発明のプローブとのハイブリダイゼーションが起こるようにする。この相補性は完全に必要ではなく；いくつかの塩基対の不一致は存在してもよく、標的配列および本発明の単ストランド核酸間のハイブリダイゼーションを妨害する。しかしながら、ハイブリダイゼーションが最小のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件の下でさえも起こらないほど変異体の数が非常に多い場合、配列は相補的な標的配列ではない。したがって、本明細書の「実質的に相補的」なる用語は、プローブが標的配列に対して十分に相補的であり、選択された反応条件下でハイブリダイゼーションすることを意味する。高いストリンジェンシー条件は当該分野では公知であり、例えば、Maniatisらの *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d Edition, 1989, および Ausubel らの *Short Protocols in Molecular Biology*, ed. を参照されたい。これら両方の引用文献は出典明示し本明細書に組み入れる。ストリンジェント条件は配列依存性であり、異なる環境において異なるであろう。より長い配列はより高温で特異的にハイブリダイゼーションされる。核酸のハイブリダイゼーションに対するさらなるガイドは Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993) に見られる。一般に、イオン強度 pH で特異的な配列に対して融解温度 ( $T_m$ ) より約 5 ~ 10 °C 低く定義したストリンジェント条件が選択される。 $T_m$  は標的配列に対して相補的なプローブの 50 % が平衡で標的配列にハイブリダイゼーションする温度である（一定のイオン強度、pH および核酸濃度下で）（標的配列が過剰に存在するので、 $T_m$  において、p

ローブの50%が占めている)。ストリンジェント条件は塩濃度が少なくとも7.0~8.3のpHで、約1.0Mのナトリウムイオン、典型的には約0.04~1.0Mのナトリウムイオン濃度(または他の塩)より小さいものであり、短いプローブ(例えば10~50ヌクレオチド)に関して少なくとも約30℃であり、長いプローブ(例えば、50ヌクレオチドより長い)に関して少なくとも約60℃であろう。また、ストリンジェント条件はホルムアミドのような不安定化剤の添加でも達成できる。他の具体例において、あまりストリンジェントでないハイブリダイゼーション条件が使用され;例えば、中程度または低いストリンジェンシー条件が使用され、これは当該分野で公知であり、ManiatisおよびAusubel,の上掲文献およびTijssenの上掲文献を参照されたい。

【0126】

本明細書の「標的配列」または文法上同義語は、核酸の単ストランドの核酸配列を意味する。標的配列は遺伝子、調節配列、ゲノムDNA、cDNA、mRNAおよびrRNAを含むRNA、または他のものの一部であってもよい。これはいずれの長さであってもよく、より長い配列はより特異的であることが理解できる。当業者に明らかなように、相補的な標的配列は多くの形態であってもよい。例えば、これは長い核酸配列、すなわち遺伝子またはmRNAの全てまたは一部、プラスミドまたはゲノムDNAの制限フラグメント、他のものの中に含まれていてもよい。以下により完全に説明するように、プローブは試料中の標的配列の存在または非存在を決定する標的配列にハイブリダイゼーションするために作成される。一般的に言えば、この用語は当業者に明らかだろう。

好ましい具体例において、生物活性剤は有機化学基であり、これらは広範囲にわたって文献により利用できる。

【0127】

好ましい具体例において、各々のビーズは単一型の生物活性剤を含むが、各々の生物活性剤の多くは、好ましくは各々のビーズに付着できる。同様に、好ましい具体例は、独特の生物活性剤を含む1つ以上のマイクロスフェアに有用であり、これらはマイクロスフェアの亜集団の使用により系中に重複して構築され、亜集団中の同じ生物活性剤を含むものである。当業者に明らかなように、生物活性



剤はビーズ上に直接合成するか、または作成でき、ついで合成後に付着させることもできる。好ましい具体例において、リンカーはビーズに生物活性剤を付着させるために使用され、両方を良好に付着させ、十分に固定し、標的分子と良好に相互作用し、望ましくない結合反応を防ぐ。

好ましい具体例において、生物活性剤はビーズ上に直接合成する。当該分野で公知のように、化学化合物の多くの群はビーズ、例えばペプチド、有機基および核酸を含む固体担体上で容易に合成される。

好ましい具体例において、生物活性剤を最初に合成し、ついでビーズに共有結合させる。当業者に明らかなように、これは生物活性剤およびビーズの組成に依存して行われるだろう。固体担体表面、例えばある種のポリマーを化学活性基、例えばチオール、アミン、カルボキシル等で機能化することは、一般に当該分野で公知のものである。したがって、「ブランク (blank)」マイクロスフェアが使用でき、これは使用者により望ましい官能基の付着を促進する表面化学を有する。ブランクマイクロスフェアに関するこれらの表面化学のいくつかの例示は、限定するものではないが、脂肪族および芳香族アミンを含むアミノ基、カルボン酸、アルデヒド、アミド、クロロメチル基、ヒドラジン、ヒドロキシル基、スルホラートおよびスルフェートを含む。

#### 【0128】

これらの官能基は、一般に公知の化学的方法を使用して、ビーズにいくつかの異なる候補物質を付加させるために使用できる。例えば、炭化水素を含む候補物質は、標準的な方法を使用して作成され、ついでアルデヒドを表面のアミノ基と反応させる。別の具体例において、スルフヒドリルリンカーが使用できる。当該分野で公知の多くのスルフヒドリル活性リンカー、例えばSPDP、マレイミド、 $\alpha$ -ハロアセチルおよびピリジルジスルフィド（例えば、1994 Pierce Chemical Company catalog, technical section on cross-linkers, 155-200頁参照、これは出典明示し本明細書に組み入れる）があり、これらは担体にシステイン含有蛋白様物質を付着させるために使用できる。別法として、候補物質上のアミノ基が、表面上のアミノ基への付着のために使用できる。例えば、多くの安定な二官能基は当該分野でよく知られており、ホモ二官能基およびヘテロ二官能基リン

カー（Pierceのカatalogおよびハンドブック、155-200頁参照）を含む。付加的な具体例において、カルボキシル基（表面または候補物質由来のもの）は、よく知られたリンカー（Pierceのカatalog参照）を使用して誘導できる。例えば、カルボジイミドは、良好な求核剤、例えばアミンによる攻撃に対してカルボキシル基を活性化する（Torchilinらの Critical Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems, 7(4):275-308 (1991) 参照、本明細書に完全に組み入れる）。また、蛋白様候補物質は、当該分野で公知の他の方法、例えば重合体への抗体の付着のための方法を使用して付着できる（Slinkin らの Bioconj. Chem. 2:342-348 (1991); Torchilin らの上掲文献; Trubetskoy らの Bioconj. Chem. 3:323-327 (1992); King らの, Cancer Res. 54:6176-6185 (1994); および Wilbur らの Bioconjugate Chem. 5:220-235 (1994) 参照、これら全ては出典明示し本明細書に組み入れる）。候補物質は、上記のものを含む種々の方法で付着できることが理解できるだろう。好ましくは、付着方法は候補物質の機能性を有意には変化させず；候補物質は標的との相互作用を可能にする柔軟な方法で付着されるべきである。加えて、化学的または物理的機能の型がアレイを付着させるために使用でき、図 1 F に記載のように、各々のビーズの位置または組を分析できる。

#### 【0129】

酵素を微小球上に固定する具体的な方法は当該分野にて公知である。一の場合において、NH<sub>2</sub>面の化学微小球を用いる。表面活性化は、pHを6.9とするリン酸緩衝化セイライン（10 mM）（138 mM NaCl、2.7 mM KCl）中2.5%グルタルアルデヒドでなされる。これを室温で約2時間攪拌床上で攪拌する。その微小球を0.01% - 0.02% ツーリー 20（界面活性剤）を加えた超精製水で洗い流し、再び0.01% ツーリー 20を加えたpH 7.7のPBSで洗い流す。最後に、好ましくは0.45 μmのアミコン微小孔のフィルターを用いて予備濾過した後に、酵素を溶液に加える。

ある具体例においては、微小球は付加的に特定の解読システムに用いるためのアイデンティファイアー結合リガンドを含んでいてもよい。本明細書中の「アイデンティファイアー結合リガンド」または「IBL」とは、対応する解読結合リガンド（DBL）と特異的に結合し、ビーズに付着する生物活性体の同一性の解

明を促進するであろう化合物を意味する。すなわち、IBLと対応するDBLは結合パートナーのペアを形成する。本明細書中の「特異的に結合する」とは、IBLが対応するDBLと他のDBL（すなわち、他のIBLについてのDBL）または該システムの他の成分もしくは汚染物の間の差異を認めるのに十分な特異性をもってその対応するDBLと結合することを意味する。結合は、非特異的結合を除去するための洗浄工程を含む、解読工程の条件下で結合状態を維持するのに十分でなければならない。ある具体例において、例えば、IBLおよび対応するDBLが蛋白または核酸である場合、IBLのそのDBLに対する解離定数は約 $10^{-4} - 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ 未満であり、約 $10^{-5}$ ないし $10^{-9} \text{ M}^{-1}$ 未満が好ましく、約 $10^{-7} - 10^{-9} \text{ M}^{-1}$ 未満が特に好ましい。

【0130】

IBL-DBL結合ペアは既知であるか、あるいは公知技法を用いて容易に見出すことができる。例えば、IBLが蛋白である場合、DBLは蛋白（特に、抗体またはそのフラグメント（FAbなど）または小分子を包含し、あるいはその逆（IBLが抗体で、DBLが蛋白である）である。金属イオン-金属イオンリガンドまたはキレーターペアもまた有用である。抗原-抗体ペア、酵素および基質または阻害剤、他の蛋白-蛋白相互作用性ペア、受容体-リガンド、相補的核酸（三重螺旋を形成する核酸分子を含む）および炭水化物およびその結合パートナーもまた、適当な結合ペアである。一本鎖または二本鎖核酸結合蛋白、および小分子核酸結合体を含む、核酸-核酸結合蛋白ペアもまた有用である。同様に、出典明示により本明細書の一部とする、米国特許第5270163号、第5475096号、第5567588号、第5595877号、第5637459号、第5683867号、第5705337号および関連する特許に記載されるように、核酸「アプタマー」を実質的にいずれかの標的に結合させるために開発することもできる；そのようなアプタマー-標的ペアをIBL-DBLペアとして用いることができる。同様に、コンビナトリアルケミストリー方法に基づいて結合ペアの開発に関連するワイドボディーの文献もある。

【0131】

好ましい具体例において、IBLは選択的に結合するDBLの存在下で色相ま

たは発光特性が変化する分子である。

一の具体例において、DBLをビーズ、すなわち、フルオロフォアなどの標識を有していてもよい「デコーダービーズ」に付着させることができる。

好ましい具体例において、IBL-DBLペアは実質的に相補的な一本鎖核酸を含む。この具体例において、結合リガンドを「アイデンティファイアープローブ」および「デコーダープローブ」ということができる。一般に、アイデンティファイアープローブおよびデコーダープローブは、長さが約4個の塩基対から約1000個の範囲であり、約6個ないし約100個が好ましく、約8個ないし約40個が特に好ましい。重要なことは、特異的であるのに、すなわち、異なるIBL-DBLペアの間を区別するのにプローブが十分に長く、しかも、a) 必要に応じて、適当な実験条件下での解離、およびb) 効果的なハイブリダイゼーションを可能とするのに十分に短いことである。

#### 【0132】

好ましい具体例において、以下にさらに詳しく記載するように、IBLはDBLと結合しない。むしろ、IBLは、例えば、質量分光器の使用を介して、直接同定されるアイデンティファイアープローブ部分(IM)として用いられる。

別法として、好ましい具体例において、IBLと生体活性体とは同一部分である；かくして、例えば、本明細書において記載するように、特に、光学的特徴を用いない場合、生体活性体はアイデンティファイアープローブおよびその活性体の両方として用いることができる。例えば、核酸の場合、ビーズ結合プローブ（生体活性体として役立つ）もまたデコーダープローブと結合し、ビーズ上にあるプローブの配列を同定することができる。かくして、この具体例において、DBLは生体活性体と結合する。このことは、この具体例が解読に加えてアレイまたはアッセイについての情報を付与することができるため、特に有用である。例えば、以下により詳細に記載されるように、DBLの使用はアレイキャリブレーションおよびアッセイ開発を可能とする。このことは仮にDBLその物が例えば非ランダムアレイにて用いられないとしても行うことができ、これらプローブセットの使用は、たとえ解読が要求されないとしても、アレイキャリブレーションおよびアッセイ開発が可能である。

## 【0133】

好ましい具体例において、微小球は光学的特徴を含まない。すなわち、米国出願番号08/818199および09/151877に記載されているように、これまでの研究では、各部分集団が独特な光学的特徴または光学タグを含む微小球を有し、それを微小球の部分集団の独特な生物活性体を同定するために用いる；すなわち、解読はビーズの光学特性を利用するものであり、独特な光学的特徴を含むビーズを異なる光学的特徴を有する他の位置にあるビーズから区別するものである。かくして、これまでの研究は、生体活性体を含む微小球が該特徴に基づいて同定可能であるような独特な光学的特徴を各生体活性体に帰属させた。これらの光学的特徴は、ビーズ自体にトラップされるかまたは付着される染料、通常、クロモフォアまたはフルオロフォアを含んだ。光学的特徴の多様性において、種々の蛍光色素、種々の割合の蛍光色素混合物、および種々の濃度（強度）の蛍光色素を用いた。

## 【0134】

かくして、本発明は、アレイを解読するために、ある場合には光学特性に依存するとしても、それだけに依存する必要はない。しかしながら、当業者にとって明らかなように、ある具体例において、このシステムと協同して、さらなるコード化方法として光学的特徴を用いることが可能である。かくして、例えば、以下にさらに詳しく記載するように、アレイの大きさは、いくつかの方法で一セットの解読部分を用いて効果的に増大されることができ、その方法のうちの一は、一のビーズ上の光学的特徴と組み合わせて用いるものである。かくして、例えば、一「セット」の解読分子を用いて、光学的特徴を有するものと光学的特徴を有していないものとの2つのビーズ集団の使用は、アレイの大きさを効果的に倍にすることができる。同様に、複数の光学的特徴の使用はアレイの大きさの可能性を増大させる。

## 【0135】

好ましい具体例において、ビーズの各部分集団は、複数の異なるIBLを含む。各生体活性体をコードするために複数の異なるIBLを用いることによって、可能となる独特なコードの数を実質的に増加する。すなわち、生体活性体につき

1個の独特なIBLを用いることによって、アレイの大きさは、（以下に記載するように、「再使用」が生じないと仮定すると）独特なIBLの数となるであろう。しかしながら、各IBLの有無を指標として用いた場合、ビーズ1個につき複数の異なるIBL  $n$  個を用いることによって、アレイの大きさを  $2^n$  に増大させることができる。例えば、ビーズ1個につき10個のIBLの帰属させると、10ビット二進法コードが得られる（ここで、各ビットは「1」（IBLが存在する）または「0」（IBLが存在しない）で表すことができる）。10ビット二進法コードは可能となる  $2^{10}$  種の変数を有する。しかしながら、以下にさらに詳しく検討するように、アレイの大きさは、濃度または強度のような別のパラメーターが含まれる場合にはさらに増大させることができる；かくして、例えば、2種類の異なる濃度のIBLを用いる場合、アレイの大きさは  $3^n$  に増大する。かくして、この具体例において、アレイにおける個々の生体活性体は、各々、IBLの組み合わせに帰属させられ、そのIBLは生体活性体を付加する前、生体活性体の合成の後、または生体活性体の合成の間、すなわち、IBLと生体活性体成分の同時付加の間にビーズに付加することができるIBLの組合せを付与される。

#### 【0136】

別法として、生体活性体がポリマーまたは異なる残基である場合、すなわち、生体活性体が蛋白または核酸である場合、種々のIBLの組み合わせを用いて蛋白または核酸の配列を解明することができる。

かくして、例えば、2つの異なるIBL（IBL1およびIBL2）を用いて、核酸の第1の位置を解明することができる；例えば、アデノシンはIBL1およびIBL2の両方が存在することによって表すことができ；チミジンはIBL1が存在するが、IBL2が存在しないことによって表すことができ；シトシンはIBL2が存在するが、IBL1が存在しないことによって表すことができ、グアノシンは両方が存在しないことによって表すことができる。核酸の第2の位置は、IBL3およびIBL4を用いて同様に行うことができ；かくして、IBL1、IBL2、IBL3およびIBL4の存在はAAの配列を示し；IBL1、IBL2およびIBL3の存在は配列ATを示し；IBL1、IBL3および

I B L 4 の存在は配列 T A を示すなどである。第 3 の位置は、I B L 5 および I B L 6 を用いるなどである。このようにして、20 個の異なるアイデンティファイアーを用いて、全ての可能となる 10 量体についての独特なコードを得ることができる。

【0137】

このシステムは蛋白と同様であるが、各位置にある許容される多様性に応じて、各位置を同定するのにより多くの数の異なる I B L を必要とする。かくして、例えば、すべてのアミノ酸がすべての位置で許容されるならば、各位置について 5 個の異なる I B L が必要とされる。しかしながら、上述したように、例えば、生体活性体としてランダムペプチドを用いると、該システムの中に構築される傾向があるかもしれず；すべてのアミノ酸がすべての位置に存在するものではなく、ある位置は予めセットされていてもよい；したがって、各アミノ酸について 4 つの異なる I B L を利用することが可能である。

このようにして、各配列についての「バーコード」の分類を構築することができる；別個の各々の I B L の有無は各生体活性体の同定を可能とするであろう。

【0138】

加えて、種々の濃度または密度の I B L を使用することで分類の「再使用」を可能とする。例えば、第 1 の物質を含むビーズが 1 倍濃度の I B L を有しており、第 2 の物質を含む第 2 のビーズが 10 倍濃度の I B L を有する場合、対応する標識された飽和濃度の D B L を用いることでユーザーに 2 つのビーズを区別させることができる。

候補物質および独特な I B L を含む微小球が生成されたならば、それらを基材に付加してアレイを形成させる。本明細書に記載された方法のほとんどは、アッセイ前にビーズを基材に付加するが、アレイの調製、使用および解読の順序を変えることができる。例えば、アレイを調製し、解読し、次いで、アッセイを行うことができる。また、アレイを調製し、アッセイにおいて使用し、次いで、解読することができる；これは、ほんのわずかなビーズを解読する必要がある場合に特に有用であることが分る。また、基材にビーズを付加する前に、アッセイ混合物、すなわち、標的とする分析物を含有する試料にビーズを付加することができ

る；付加およびアッセイの後にアレイを解読してもよい。これは、ビーズを含む試料を攪拌または混合した場合に特に好ましい；この操作は単位時間あたりにビーズに結合した標的分析物の量を増加させることができ、かくして、（核酸アッセイの場合に）ハイブリダイゼーション速度を増大させることができる。これは、試料中の標的分析物の濃度が低い場合に特に有用であることが分る；一般に、低濃度の場合、結合時間を長くしなければならない。

【0139】

加えて、ビーズをアッセイ混合物に添加することにより、分類または選択を行うことができる。例えば、ラージライブラリーのビーズを試料に加え、そして試料に結合するビーズだけを基材中に添加することができる。例えば、標的分析物が蛍光標識（直接的に（例えば、標識を核酸増幅反応中に組み入れることにより）あるいは間接的に（例えば、サンドウィッチアッセイを用いることにより））されているならば、標的分析物が結合した結果として蛍光を発するビーズを蛍光活性化細胞分類操作（Fluorescence Activated Cell Sorting）（FACS）を介して分類することができ、これらビーズだけをアレイに加え、つづいて解読することができる。同様に、アフィニティー技法；標的分析物を含むアフィニティーカラムを製造し、結合するビーズだけを該アレイに用いる、技法を介して分類を行うことができる。同様に、2つのビーズシステム；例えば、標的分析物を含む磁気ビーズを用いて標的に結合するであろうビーズを「プルアウト」し、つづいてその後、（例えば、昇温させることで）磁気ビーズを放出させ、アレイに付加する、システムを用いることができる。

【0140】

一般に、アレイの調製方法およびアレイの解読方法は、独特にコードされ得る種々の候補物質の数を最大にするように行われる。本発明の組成物は、種々の方法で調製される。一般に、アレイは、ビーズの付着のための部位を含有する表面にビーズを含む溶液またはスラリーを添加することによって調製される。これは、水性溶媒および有機溶媒を包含する種々のバッファーおよび混合物において行われる。溶媒を蒸発させ、過剰のビーズを除去することができる。

【0141】



好ましい具体例において、非共有方法を用いてビーズをアレイに結合させる場合、ビーズをアレイに負荷させる新規方法が用いられる。この方法はアレイを粒子（微小球および細胞を包含する）の溶液に曝し、次いで、エネルギーを加え、例えば、該混合物を攪拌または振動させることを含む。これにより、弱く結合したビーズを外す（ウェルの場合には、落とす）のに十分なエネルギーを用いて攪拌が行われた場合には、より固く結合した粒子を含むアレイが得られる。ついで、これらの部位は異なるビーズを結合するのに利用可能である。このようにして、部位に対して高いアフィニティーを示すビーズを選択する。このようにして調製したアレイは、より安定した負荷と比較して2つの主要な利点を有している：その一つは、この部位を高いパーセンテージで容易に充填することができ、二つ目は、このようにして負荷されたアレイは、アッセイの間のビーズの損失が実質的に低下することを示す。すなわち、好ましい具体例において、これらの方法を用いて、少なくとも約50%、好ましくは、少なくとも約75%、特に好ましくは、少なくとも約90%の充填部位を有するアレイが得られる。同様に、このようにして得られたアレイは、好ましくは、アッセイの間にビーズの約20%未満、好ましくは、約10%未満、特に好ましくは、約5%未満を損失する。

#### 【0142】

この具体例において、別個の部位を有する表面を含む基材を、粒子（ビーズ、細胞など）を含む溶液中に浸漬する。表面は、本明細書に記載するように、ウェル、または、該部位に対して示差アフィニティーがあるようなパターン化された表面上の他の型の部位を含んでもよい。この示差アフィニティーにより競合工程に至り、その結果、さらに強固に結合する粒子が選択される。好ましくは、ビーズで「負荷」されるべき全表面は溶液と流動接触している。この溶液は、一般に、ビーズ：溶液（vol：vol）が約10,000：1ないし1：1の範囲にあるスラリーである。一般に、該溶液は、水性バッファー、有機溶媒、塩、他の試薬成分などを包含するかなり多数の試薬を含むことができる。加えて、該溶液は、好ましくは、過剰のビーズを含む；すなわち、アレイ上の部位よりも多くのビーズがある。好ましい具体例は2倍ないし10億倍過剰量のビーズを用いる。

#### 【0143】

浸漬はアッセイ条件を模倣することができる；例えば、アレイが上から試料を含むマイクロタイタープレート中に「浸漬される」ものである場合、負荷に対するこの配置を繰り返し、重力により落下する可能性のあるビーズを最小にすることができる。

表面が浸漬されれば、基材、溶液またはその両方を競合工程に付し、それにより、低いアフィニティーの粒子を基材から解離させ、その部位に対して高いアフィニティーを示す粒子と置き換えることができる。この競合工程は、溶液もしくは基材またはその両方を、加熱、音波処理、攪拌もしくは混合、振動またはかき回す、形態のエネルギーの導入によって行われる。

好ましい具体例は攪拌または振動を用いる。一般に、基材の操作の量を最小限にしてアレイに対する損傷を妨げる；かくして、好ましい具体例はアレイよりもむしろ溶液の攪拌を用いるが、いずれも有効に作用するであろう。当業者に明らかのように、この攪拌はかなり多くの形態をとることができ、好ましい具体例としては、マイクロタイタープレート振盪器を用いて攪拌されるビーズ溶液を含むマイクロタイタープレートを用いることである。

#### 【0144】

攪拌をアレイが所望の量で満たされるのに十分な時間行う。ビーズの大きさおよび濃度ならびにアレイの大きさに応じて、この時間は約1秒から数日の範囲とすることが可能であり、約1分から約24時間が好ましい。

アレイの部位のすべてがすべてビーズを含むものではないこと、すなわち、基材表面に空の部位があってもよいことに留意すべきである。加えて、好ましいわけではないが、1個よりも多くのビーズを含有する部位があってもよい。

ある場合において、例えば、化学的付着を行う場合、ビーズをランダムではなく、または秩序立てて付着させることが可能である。例えば、光活性化可能な付着性リンカーまたは光活性化可能な付着物質またはマスクを用い、ビーズの一定の集団に播種するように、アレイ上の選択された部位を連続的に付着に適するようにすることができる。

#### 【0145】

候補物質の同一性についての情報がアレイの中に組み込まれるように本発明の

アレイを構築する。その結果、ファイバーウェル中のビーズのランダムな堆積が「解読」され、あらゆる位置での候補物質を同定することができる。このことは、アレイを使用する前、間、または後のいずれであっても、標的とする分子を検出するための種々の方法にて行うことができる。

かくして、アレイを作製した後に、基材表面上にある、1またはそれ以上の生体活性体、すなわち、ビーズの各部分集団の位置を同定するためにそのアレイを「解読」する。図11は、限定されるものではないが、本発明のアレイおよびハイブリダイゼーションチャンバーを用いて行うことができるアッセイのフローチャートを示す。

#### 【0146】

好ましい具体例においては、選択的解読システムを使用する。この場合、標的分析物の結合の結果として光シグナルの変化を示す微小球だけが解読される。この操作は、一般に、「ヒット」の数、すなわち、解読される部位の数が一般に少ない場合に行われる。すなわち、標的分析物の不存在の下にある実験的条件下でまずアレイをスキャンする。標的分析物を含有する試料を加え、光シグナルの変化を示す位置だけを解読する。例えば、ビーズの正または負のシグナル位置を選択的にタグ化またはアレイから放出させ（例えば、光切断可能なリンカーを用いて）、その後、蛍光活性化細胞ソーター（FACS）にて分類または豊富化させる。すなわち、すべての負のビーズを放出させ、ついで正のビーズを放出させるかもしくはインサイチュにて分析するか、あるいはまたすべての正のビーズを放出させて分析する。別法として、標識はハロゲン化芳香族化合物を含んでいてもよく、その標識の検出を、例えば、ガスクロマトグラフィー、化学タグ、アイソトープタグ、マススペクトルタグを用いて行う。

#### 【0147】

当業者に明らかなように、このことはまた、アレイが解読されていない；すなわち、今までにビーズの組成と位置とを相関付ける必要もなかった、システムにて行うこともできる。この具体例においては、ビーズをアレイ上に負荷させて、アッセイを行う。ついで、「正」の、すなわち、以下により詳細に示すように光シグナルの変化を示すそれらのビーズを、「負」のビーズと区別または分離する

ように「マーク」を付す。この操作は、数種の方法、好ましくは光ファイバーアレイを用いて行うことができる。好ましい具体例において、各ビーズは蛍光染料を含有する。アッセイを行い、「正」または「活性ビーズ」を同定した後、一般に、光活性化試薬（典型的には、溶存酸素）の存在下で、正のファイバーだけに、または負のファイバーだけに光を照らす。前者の場合、活性ビーズはすべて光漂白される。かくして、すべてのビーズを、例えば、蛍光活性化細胞ソーター（FACS）装置を用いるその後の分類操作で非選択的放出に付した後、非蛍光的な活性ビーズを蛍光的な負のビーズから分類することができる。また、負のファイバーに光を照らすと、負はすべて非蛍光的であり、正は蛍光的であり、分類を進めることができる。付着した生体活性体の特徴化を、例えば、質量分光器を用いて直接行うこともできる。

#### 【0148】

また、同一化が、IBLに類似するが、必ずしもDBLに結合する必要のない、アイデンティファイアー部分（「IM」）の使用を介して起こるかもしれない。すなわち、生体活性体の構造を直接解明するよりもむしろ、IMの組成物をアイデンティファイアーとして供することができる。かくして、例えば、IMの特異的な組み合わせをビーズをコードするのに供し、それをビーズからの放出でビーズ上にある物質を同定し、つづいてその後の、例えば、ガスクロマトグラフィーまたは質量分光器を用いる、分析に用いることができる。

別法として、各ビーズは、蛍光染料を含有するというよりもむしろ、蛍光染料の非蛍光前駆体を含む。例えば、蛍光分子上の特定のオルトニトロベンジル基などの光切断可能な保護基を用い、蛍光色素の光活性化を行うことができる。アッセイを行った後、再び「正」または「負」のファイバーのいずれかに光を照射し、これらの集団を区別する。ついで、そのイルミネートされた先駆体を化学的に蛍光染料に変える。ついで、すべてのビーズを分類操作に付しながら、アレイから放出させ、蛍光および非蛍光ビーズ（正および負あるいはその逆）の集団を形成させる。

#### 【0149】

別の好ましい具体例において、ビーズ（例えば、ウェル）の付着部位が光重合

可能な試薬を含むか、あるいは光重合可能な試薬が集合アレイに付加されている。試験アッセイを行った後、光を再び「正」または「負」のファイバーのいずれかに照射し、これらの集団を区別する。その照射の結果として、すべての正またはすべての負が重合して、その部位にトラップまたは結合され、他のビーズの集団を該アレイから放出させることができる。

好ましい具体例において、あらゆる生体活性体の位置を解読結合リガンド (DBL) を用いて測定する。上述したように、DBLは、存するとすればアイデンティファイアール結合リガンドに、あるいは、好ましくは生体活性体が核酸または蛋白である場合の、生体活性体それ自身に結合するはずの結合リガンドである。

好ましい具体例において、DBLは、上述したように、IBLに結合する。

#### 【0150】

好ましい具体例において、生体活性体は一本鎖核酸であり、DBLは、本明細書中、デコーダープローブと称される、生体活性体に結合 (ハイブリッド形成) する実質的に相補的な一本鎖核酸である。候補プローブの各々に実質的に相補的なデコーダープローブを製造し、アレイを解読するのに使用する。この具体例において、候補プローブおよびデコーダープローブは特異性を付与するのに十分な長さ (解読工程は適当な条件下で行う) でなければならない; すなわち、候補プローブは各々、各候補プローブの区別を可能とするのに十分に特異的に、その対応するデコーダープローブに結合しなければならない。

好ましい具体例において、DBLは直接的または間接的のいずれかで標識されている。本明細書中の「標識されている」とは、一の化合物が化合物の検出を可能とするように結合した少なくとも1個の因子、アイソトープまたは化合物を有することを意味する。一般に、標識は3つのクラス: a) アイソトープ標識であり、放射活性または重アイソトープとすることができる; b) 磁気、電気、熱; および c) 着色または発光染料に分けられるが、標識は酵素および磁気粒子などの粒子を包含する。好ましい具体例においては、DBLを直接標識し、すなわち、DBLは標識を含む。もう一つ別の具体例において、DBLを間接的に標識する; すなわち、DBLに結合するであろう標識化結合リガンド (LBL) を使用する。この具体例において、標識化結合リガンド-DBLペアをIBL-DBL

ペアについて上述したものとするができる。適当な標識は、限定されるものではないが、ユーロピウムとテルビウム、フルオレセイン、ローダミン、テトラメチルローダミン、エオシン、エリスロシン、クマリン、メチルクマリン、ピレン、マラサイト・グリーン、スチルベン、ルシファー・イエロー、カスケード・ブルー（登録商標）、テキサス・レッド、FITC、PE、cy3、cy5およびリチャード・ピー・ホーランドによるモレキュラー・プローブ・ハンドブックの第6版に記載されている別の化合物の複合体を含む、蛍光性ランタニド複合体を包含する。

#### 【0151】

一の具体例において、標識は、局所的環境の変化により、IBLの存在下にある着色または発光特性が変化する分子である。例えば、標識は：（1）pHと共に発光強度が変化する蛍光性pHインジケーター；（2）イオン濃度と共に発光特性が変化する蛍光性イオンインジケーター；または（3）疎水性環境下で発光強度が増加するエチジウム塩などの蛍光性分子である。

したがって、個々のビーズ（またはビーズの部分集団）の位置の同定を、標識化DBLとIBLまたは生体活性体の間の結合（すなわち、候補プローブと、生体活性体が核酸である場合のデコーダープローブとの間のハイブリダイゼーション）を含む1またはそれ以上の解読工程を用いて行う。解読した後、DBLを除去し、そのアレイを用いることができる；しかし、ある環境下、例えば、DBLが生体活性体ではなく、IBLに結合する場合、（ある環境下では望ましいかもしれないが）DBLの除去は不要である。加えて、本明細書中で述べたように、アレイをアッセイに使用する前、アッセイの間、またはアッセイの後のいずれにおいても解読を行うことができる。

#### 【0152】

一の具体例において、単一の解読工程を行う。この具体例において、DBLの各々を独特標識で標識化する。そのために、独特標識の数は生体活性体の数に等しいか、またはそれより多い（ただし、ある場合には、本明細書中に記載されるように、独特標識を「再利用」することもできる；同様に、候補プローブの少数の変種が別の次元にて、すなわち、ビーズの大きさまたは標識にてコード化され

ているならば、そのような変種は同じデコーダーを共有することができる)。生体活性体またはIBLの各々の場合、それと特異的に結合し、独特標識、例えば1またはそれ以上の蛍光色素を含有するDBLを調製する。かくして、各DBLの同一性、その組成(すなわち、核酸である場合のその配列)およびその標識は共に知られている。ついで、DBLと生体活性体またはIBLのいずれかの間の複合体(成分が核酸である場合にハイブリダイゼーション複合体と称される)の形成を可能とする条件下、DBLを生体活性体を含有するアレイに付加することにより、各DBLの位置を解明することができる。このことにより、各生体活性体の位置を同定することができ;ランダムアレイが解読される。ついで、必要ならば、DBLを取りだし、標的とする試料を適用することができる。

### 【0153】

好ましい具体例において、独特標識の数を独特な生体活性体の数よりも少なくし、そうして一連の解読工程を使用する。話を簡単にするために、この具体例は核酸について説明するが、他の型の生体活性体およびDBLを同様に有用である。この具体例において、デコーダープローブを解読操作のために $n$ 個のセットに分ける。セットの数は独特タグの数に対応する。各デコーダープローブを $n$ 個の別々のタグを有する $n$ 個の別々の反応にて標識化する。デコーダープローブはすべて同じ $n$ 個のタグを共有する。各プールのデコーダーが各デコーダーの $n$ 個のタグのバージョンの1個だけを含み、2つのデコーダープローブがすべてのプールを通して同じ配列のタグを有することがない。これを正当化するために必要なプールの数は、デコーダープローブの数および $n$ の数により決定される。各プールをアレイにハイブリダイゼーションすると、IBLを含む処理毎にシグナルを発生する。各プールを、順次、連続的にハイブリダイゼーションすると、各候補プローブにつき独特な配列特異的コードが得られる。これにより各処理のアレイにおける候補プローブを同定する。例えば、4個のタグを用いる場合、 $4 \times n$ 回の連続したハイブリダイゼーションで、理想的には $4^n$ 個の配列を区別することができるが、ある場合には、さらなる工程を必要とするかもしれない。各プールをハイブリダイゼーションに付した後、ハイブリッドは変性され、デコーダープローブは除去されているため、次のハイブリダイゼーションに備えて、プロ

ブを一本鎖にする（ただし、利用可能なプローブが飽和状態とならないように、標的の数を限定してハイブリダイズすることも可能である。逐次的ハイブリダイゼーションは前のハイブリダイゼーションから前に存在するシグナルを減ずることにより行い、分析することができる）。

【0154】

当該分野の専門家には認識されるように、ハイブリダイゼーションまたはインキュベーションの時間は異なる。一般に、ハイブリダイゼーションまたはインキュベーションの時間は秒から分まで続き、または時間もしくは日もしくはそれ以上まで続く。本明細書に開示されるハイブリダイゼーションチャンバーを用いる場合、ハイブリダイゼーションまたはインキュベーション時間は該ハイブリダイゼーションチャンバーを用いないインキュベーション時間よりも増すことができる。

【0155】

例を示す。16のプローブ核酸(番号1-16)のアレイおよび4のユニークなタグ(4の異なる粉体(flour)、例えば、標識A-D)を想定する。ビーズ上のプローブに対応するデコーダープローブ1-16を作成する。第一ステップは、デコーダープローブ1-4をタグAで、デコーダープローブ5-8をタグBで、デコーダープローブ9-12をタグCで、およびデコーダープローブ13-16をタグDで標識することである。プローブを混合し、次いで該プールを結合候補プローブを有するビーズを含むアレイと接触させる。各タグの位置(および次いで各デコーダーおよび候補プローブ対)を次いで決定する。デコーダープローブの第一のセットを次いで除去する。第二のセットを添加するが、このとき、デコーダープローブ1、5、9および13をタグAで標識し、デコーダープローブ2、6、10および14をタグBで標識し、デコーダープローブ3、7、11および15をタグCで標識し、次いでデコーダープローブ4、8、12および16をタグDで標識する。即ち、両デコーディング段階でタグAを含むこれらのビーズは候補プローブ1を含み、第一デコーディング工程でタグAを、第二デコーディング工程でタグBを含むビーズは候補プローブ2を含み、第一デコーディング工程でタグAを、および第二工程でタグCを含むビーズは候補プローブ3を含む。当該分野



の専門家に認識されるように、デコーダープローブはいかなる順序で作成してもよく、およびいかなる順序で添加してもよい。

【0156】

一の具体例では、デコーダープローブはインサイチュで標識し、すなわち、それらはデコーディング反応の前に標識する必要はない。この具体例では、インカミングデコーダープローブは、候補プローブよりも短く、デコーディングプローブ上に5'「突出」を作成している。標識されたddNTP(それぞれユニークなタグで標識されている)およびポリメラーゼの添加により、配列特異的な方法でタグを添加することが可能となり、こうしてシグナルの配列特異的パターンが作成される。同様に、ライゲーションなどを含む他の変更を行うことができる。

【0157】

加えて、アレイのサイズはユニークなデコーディング結合リガンドの数により指定されるので、もっと多数の試験部位を許容するために、ユニークなDBLのセットを「再利用」することが可能である。これは、いくつかの方法；例えば、光学特性を含むいくつかのサブポピュレーションを用いることにより行われてよい。同様に、アレイ内におけるポジショナルコーディングスキームの使用；異なるサブバンドルがDBLのセットを再利用してもよい。同様に、一の具体例はコーディングモダリティとしてビーズサイズを利用し、こうして、各ビーズサイズに関してユニークなDBLのセットの再利用が可能となる。別法として、アレイに連続的にビーズを部分ローディングすることにより、DBLを再利用することも可能となる。さらに、「コードシェアリング」が同様に生じ得る。

【0158】

好ましい具体例では、ビーズのいくつかのサブポピュレーションに光学特性を含ませることによりDBLを再利用してもよい。好ましい具体例では、光学特性は一般にレポーター色素、好ましくは蛍光の混合物である。混合物の組成(即ち、一の色素対他の色素の比率)および色素の濃度(シグナル強度の違いを導く)の両方を変化させることにより、ユニークな光学特性のマトリックスを作成してよい。これは、色素をビーズ表面に共有結合させることにより、または別法として、色素をビーズ内にエントラップすることにより行われてよい。色素は発色団ま

たはリン光体であってよいが、好ましくは蛍光色素であり、これは、その強いシグナルにより、デコーディングのための良好なシグナル対ノイズ比が提供される。本発明における使用に適した色素には、前記のDBLを標識することに関して記載したものが含まれる。

#### 【0159】

好ましい具体例では、エンコーディングは、少なくとも2の色素の比率において達成することができるが、例えばより多くのエンコーディングディメンションをビーズのサイズに加えてもよい。加えて、標識は互いに識別可能であり、すなわち、2の異なる標識には異なる分子(即ち2の異なる粉体)が含まれてよく、または別法として、2の異なる濃度または強度の1の標識が含まれてよい。

#### 【0160】

好ましい具体例では、色素をビーズの表面に共有結合する。これは、ビーズの表面上の官能基を用いて、生物活性剤の結合に関して概説されるように行ってよい。当該分野の専門家により認識されるように、これらの結合は、色素の影響を最少にするべく行う。

好ましい具体例では、色素をビーズに、一般的にはビーズ上の孔中に色素をエントラップすることにより、非共有結合する。

#### 【0161】

加えて、2またはそれ以上の色素の比率におけるエンコーディングが、単一の色素濃度よりもむしろ好ましいが、これは、それにより、レポーター色素の特性を調べるのに用いられる光の強度およびディテクターの感受性に対してインセンシティビティが提供されるからである。

#### 【0162】

好ましい具体例では、空間的または位置的コーディングシステムを行う。この具体例では、サブバンドルまたはサブアレイ(即ち、全アレイの部分)を用いる。テレフォンシステムとの類似により、各サブアレイは他のサブアレイの同じ標識(即ち、テレフォンナンバー)を有することができる、サブアレイの位置により識別される「領域コード」である。すなわち、例えば、同じユニークな標識をバンドルからバンドルへと再利用することができる。つまり、50のユニークな標識

を100の異なるサブアレイと組み合わせて用いて、5000の異なる生物活性剤のアレイを作成することができる。この具体例では、1のバンドルを他から分けることができることが重要となり、一般に、これは手動またはマーカークビーズの使用によるかのいずれかで行われ、これらは、各サブアレイのためのユニークなタグを含むビーズ、または種々の量の同じマーカークビーズの使用、または異なる比率での2またはそれ以上のマーカークビーズの使用であり得る。

【0163】

別の具体例では、さらなるエンコーディングパラメータ、ミクロスフィアサイズなどを追加することができる。例えば、異なるサイズのビーズの使用により、DBLのセットの再利用も可能となり、すなわち、ミクロスフィアのエンコーディングディメンションを拡張する異なるサイズのミクロスフィアの使用が可能となる。光学ファイバーアレイは、それぞれ異なるファイバー直径または断面を有するピクセルを含ませて作成することができ、別法として、それぞれが個々のファイバーの異なる断面を有する2またはそれ以上のファイバー光バンドルを追加して、より大きなバンドルを形成することができる；または、同じサイズの断面のファイバーを有するファイバー光学バンドルは、異なるサイズのビーズと共にのみ用いることができる。異なる倍率を用いて、最大のウェルは最大のミクロスフィアで満たし、ついでより小さなウェル中のより小さなミクロスフィアへと、全サイズのウェルが満たされるまで除々に移動することができる。この方法で同じ色素の比率を用いて異なるサイズのミクロスフィアをコードし、それにより、アレイ中に存在する異なるオリゴヌクレオチド配列の数または化学的官能基の数を拡張することができる。ファイバー光学物質に関して概説されているが、本方法ならびに本明細書に概説される他の方法を、他の物質および他の結合モダリティを用いて用いることができる。

【0164】

好ましい具体例では、コーディングおよびデコーディングは、ミクロスフィアをアレイに連続ローディングすることにより行われる。本具体例において空間的コーディングに関して前に概説されているように、光学特性は「再利用する」ことができる。この具体例では、それぞれ異なる生物活性剤を含むミクロスフィア

のライブラリー(またはそれぞれ異なる生物活性剤を含むサブポピュレーション)を、例えば、所望のアレイのサイズおよびユニークなタグの数により複数のサブライブラリーに分け、それぞれ全ライブラリーのおよそ10%を含む10のサブライブラリーを形成してよく、それぞれのサブライブラリーは、同じユニークなタグを概して含む。次いで、第一のサブライブラリーを、ウェルを含むファイバー光学バンドルに添加し、各生物活性剤の位置を、一般にDBLの使用により決定する。第二のサブライブラリーを次いで添加し、各生物活性剤の位置を再び決定する。この場合のシグナルは、「第一」DBLおよび「第二」DBLのシグナル形態を含み、2のマトリックスを比較することにより、各サブライブラリー中の各ビーズの位置を決定することができる。同様に第三、第四などを添加して、サブライブラリーにより連続的に、アレイが満たされる。

#### 【0165】

好ましい具体例では、コードはいくつかの方法で「共有される」ことができる。第一の具体例では、単一のコード(即ち、IBL/DBL対)を、標的分析物のその結合強度が十分に異なる場合に2またはそれ以上の物質に対して割り当てることができる。例えば、mRNA定量アッセイに用いられる2の核酸プローブは、そのハイブリダイゼーションシグナル強度の範囲がオーバーラップしない場合、同じコードを共有することができる。これは、例えば、標的配列の一つが他のものよりもより常に高濃度で存在する場合にのみおこり得る。別法として、2の標的配列は常に同程度の濃度で存在してよいが、ハイブリダイゼーション効率は異なっていてよい。

#### 【0166】

別法として、物質が機能的に等価である場合、単一のコードを複数の物質に対して割り当てることができる。例えば、オリゴヌクレオチドプローブのセットを、特定の遺伝子の存在を検出するという共通の目的をもって割り当てする場合、プローブは、それらが配列を異にする可能性があっても、機能的に等価である。同様に、分析物のクラスまたは「ファミリー」が所望される場合、キナーゼまたはG-タンパク結合レセプターなどの、クラスの異なるメンバーに関する全プローブはコードを共有することができる。同様に、このタイプのアレイを用いて公知

遺伝子のホモログを検出することができた。この具体例において、各遺伝子は、遺伝子の異なる領域にハイブリダイズしている(すなわち配列が異なる)プローブの異種セットにより表される。プローブのセットは共通のコードを共有する。ホモログが存在する場合、それは、プローブの全てにはハイブリダイズしないがいくらかにはハイブリダイズする可能性がある。ホモロジーのレベルはハイブリダイズしているプローブのフラクションならびに平均ハイブリダイゼーション強度により示すことができる。同様に同じタンパク質に対する複数の抗体は全て同じコードを共有する。

【0167】

好ましい具体例では、自己集合したランダムアレイのデコーディングを、pH滴定に基づき行う。この具体例では、生物活性剤に加えて、ビーズは光学特性を含み、ここで、光学特性はフルオロフォアなどのpH反応性色素(ときに、「pH色素」と本明細書中呼ばれる)の使用により作成する。具体例はPCTUS98/05052およびU. S. S. N 09/151,877に概説されているものと同じであり、この両方を、本発明に用いられる色素が、溶液pHをpKa未満からpKa以上(またはその逆)に調整する場合に蛍光強度(または他の特性)の変化を示すことを除き、引用により明らかに組み込む。好ましい具体例では、好ましくは少なくとも0.5 pHユニットにより分けられる異なるpKaをそれぞれ有するpH色素のセットを用いる。好ましい具体例では、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0、10.5、11および11.5のpKaのpH色素セットを利用する。各ビーズは、pH色素のあらゆるサブセットを含むことができ、この方法により、生物活性剤に関してユニークなコードを作成する。つまり、アレイのデコーディングは、pH1からpH13までアレイを滴定し、次いで各ビーズからの蛍光シグナルを溶液pHの関数として測定することにより達成する。

【0168】

好ましい具体例では、ユニークまたは別個のタグの数を増やすさらなる方法が存在する。各ビーズ上の別個の属性を用いて、コードの数を増すことができる。加

えて、連続デコーディングにより、新たな方法でコードを再利用することが可能となる。これらの特質は互いに独立であり、従って、デコーディング工程の数および属性の数の関数としてコードの数を指数的に増すことが可能となる。しかし、単一のデコーディングステップにおいて得られるデコーディング情報の量を増すことにより、デコーディングステップの数は明らかに減る。別法として、別個のコードの数は明らかに増える。デコーディングステップ当たりの属性の数を増すことにより、所定の数のコードに関して必要とされるデコーディングステップがより少なくなる。つまり、好ましい具体例では、様々な方法を用いてアレイをデコーディングする方法に用いるための多くのコードが作成するが、必要なデコーディングステップは少なくなる。例えば、様々な異なるコーディング法を組み合わせることができる。つまり異なる「色」、色の組み合わせ(「h u e s」)、異なる強度の色もしくは h u e s またはその両方を全て組み合わせることができる。

#### 【0169】

好ましい具体例では、D B L は、ビーズに物理的属性の定量的セットまたは別個のセットを添加または包埋すること、即ち、ビーズを標識することによる。ビーズの好ましい物理的属性には、制限されるものではないが、表面の「滑らかさ」または「粗さ」、色(蛍光およびその他)、色の強度、サイズ、検出可能な化学部分、化学反応性、磁性、p H 強度、存在する色素間のエネルギー輸送効率、疎水性、親水性、吸収性、電荷、p H 感受性などが含まれる。

#### 【0170】

ビーズデコーディングスキームには、単一の定量可能な属性を各ビーズタイプに割り当てること／染み込ませることが含まれ、ここで、各ビーズのタイプはその属性の定量値が異なる。例えば、所定の数のフルオロフォアをビーズに結合し、次いでデコーディングプロセスにおいて結合されたフルオロフォアの数进行定量することができる。しかし、実際、「所定の量」の属性をビーズに結合すること、および属性を正確に測定することは問題を含む可能性がある。一般に、目的は、変動率(C V)を減じることである。変動率とは、連続標識にてビーズを標識することにおける変動を意味する。このC Vは、多くの試験において、ビーズを規

定された所定の数の標識で標識すること、ついでビーズにより放射される生じるシグナルを測定することにより決定されることができる。大きなCVはあらゆる所定の属性に関して利用可能な、および解析可能な「レベル」数を制限する。

【0171】

より確実なデコーディングスキームは、定量的な属性をコードにセグメント化するのに、絶対的な測定よりもむしろラシヨメトリックな測定を用いる。ラシヨメトリックなデコーディングは、ラベルの比率(即ち、1:10、1:1および10:1)でもってビーズを標識することを意味する。理論においては、該比率間のシグナルの違いが検出できる限りは、あらゆる数の比率を用いることができる。このプロセスによりCVは小さくなり、所定の動的範囲内でより多い属性のセグメント化が可能となる。つまり、好ましい具体例では、ラシヨメトリックなデコーディングの使用により変動係数が減る。

【0172】

加えて、当該分野の専門家により認識されるように、ラシヨメトリックなデコーディングは、種々の方法で行うことができる。この具体例では、第一デコーディング反応において第一色素(または色素の組み合わせ)強度を所定の数のDBLに付加し、連続第二デコーディング反応において第二色素強度を第二の数に付加するよりもむしろ、このラシヨメトリックな分析は、標識:非標識DBLの比率を用いることにより行ってよい。すなわち例えば100,000DBL/反応に関してセットに飽和濃度のデコーディングビーズを与える場合、第一強度デコーディングステップは、100,000標識DBLを付加することにより行ってよく、次いで、第二ステップは、10,000標識DBLおよび90,000非標識DBLを付加することにより行うことができる。平衡は、第二ステップが10分の一のシグナル強度を与えることを示す。

【0173】

定量的に測定された属性値の値の幅のために、別個のコードの数は実質上12未満にまたはそのようなコードに制限される。しかし、ビーズを異なる属性値で連続的に「ペイントすること」(即ち、属性レベルをビーズに一時的に結合すること)および「取り除くこと」(属性レベルを除去すること)により、可能なコー

ドの数が、デコーディングプロセスにおける連続ステージの数と共に指数関数的に増す。

【0174】

例を示す。例えば、9の異なるビーズタイプおよび3の識別可能な属性の分布(表1)。2の異なるステージにおいて、組み合わせとして異なったパターンの異なる属性値を有するビーズを「ペインティングすること」(標識すること)により、各ビーズタイプに関してユニークなコードが生じる、すなわち、9の別個のコードが生じる。つまり、好ましい具体例において、ビーズを複数のステージにおいて異なる属性を用いて組み合わせとして異なるパターンで標識する。これにより、各ビーズタイプに関してユニークなコードが生じる。異なる属性の例は前に開示する。ビーズの別個の属性での標識は、当該分野で公知の方法により行う。

【0175】

【表1】

	ステージ1	ステージ2	
ビーズ タイプ	属性値	属性値	コード
1	L	L	(L, L)
2	L	M	(L, M)
3	L	H	(L, H)
4	M	L	(M, L)
5	M	M	(M, M)
6	M	H	(M, H)
7	H	L	(H, L)
8	H	M	(H, M)
9	H	H	(H, H)

ユニークコードの数 =  
属性の数 ^ ステージの数

表1 連続デコードにより、少数の属性レベルを用いてユニークなコードが生じる。

【0176】

蛍光色は、デコーディングスキームに使用するための特に便利な属性である。IBLを認識するあらゆる物質に蛍光色を結合して、標識されたDBLを作成す



ることができる。DBLとしてのオリゴヌクレオチド(核酸アナログを含む)に対して考察を指向する。蛍光標識はビーズのあらゆる所望のサブセットを特定の色で、(即ち、相補的な配列を有するDBLに対して)単にハイブリダイゼーションおよび脱ハイブリダイゼーションのプロセスにより特異的および可逆的に「ペイント」(標識)することができるので、蛍光標識されたオリゴヌクレオチドは、特に有用なDBLである。さらに、蛍光は、常套の光学ハードウェアおよびソフトウェアを用いて容易に画像処理され、および定量される。所定のビーズタイプを特定色で「ペイント」するために、ビーズのタイプをユニークなハイブリダイズ可能なDNA配列(IBM)で標識しなければならず、デコーディング溶液は、色で標識されたその配列の成分を含まなければならない。

#### 【0177】

デコーディングスキームを実行するのに考慮すべきことは、集められる画像の数を最少にすることである。色に基づくスキームにおいて、集められる画像の数は色の数およびステージの数の産物である。画像の数は、ビーズを多くの色で、各所定のステージに関して「ペインティングすること」により減じることができる。複数の色をビーズに割り当てることにより、有効なコードの数が増す。例として、24ビットの3色スキーム(例えば、赤、緑、青)において、コンピューターにより用いられる着色プロセスにおいて、 $256 * 256 * 256 = 1670$ 万の異なる「hues」のトータルを単に3つの色(赤、緑、青)から作成することができる。

#### 【0178】

つまり、好ましい具体例において、DBLは着色されたフルオロフォアの組み合わせを用いて標識する。このように、この方法は、少数の異なる色素(色)のみを用いてDBLを標識するために利用できるコードの数を増すことに使用できる。各デコーディングステップに利用できるコードの数を増すことにより、所定のデコーディングプロセスに必要とされるデコーディングステップの数が大幅に減る。

#### 【0179】

一の具体例では、単一のDBLをコードしているオリゴヌクレオチドのポピュ

レーションを、着色されたフルオロフォアの組み合わせから作成される特徴的な「hue」に基づきDBLが結合する各ピーズが同定されるように、色の規定された比率を用いて標識する。好ましい具体例では、2の別個の色を用いる。好ましい具体例では、3またはそれ以上の別個の色素(色)が使用できる。この場合、単一DBLをコードしているオリゴヌクレオチドのポピュレーションをいずれかの所定の色で標識することにより作成される識別可能なコードの数は3である。しかし、色および色のレベルの組み合わせを標識において許容することにより、より多くのコードが作成される。

#### 【0180】

ハイブリダイゼーションによるデコーディングに関して、識別可能な色の明暗のより好ましい数は2～2000であり、識別可能な色の明暗のより好ましい数は2～200であり、および識別可能な色の明暗の最も好ましい数は2～20である。3の異なる色の明暗(強度)および3色を用いて、異なるhueの数は $3^4 = 81$ である。hueを連続デコーディングと組み合わせることにより、明らかに無制限の数のコードが作成される。

#### 【0181】

前記のように、DBLはIBLに結合する物質であり得る。好ましい具体例では、単一のDBLを予め決定された比率の色で標識する。この比率は各DBLで変化し、こうして、そのように標識された各DBLに関してユニークな「hue」が可能となる。ピーズのDBLを用いた処理の後、ピーズを分析して、各ピーズに結合された「hue」を決定し、それによりその結合された生物活性剤を用いてピーズを同定する。

#### 【0182】

例えば、4の主要色および2の強度レベル(色は存在または不在)を用いて、15の異なるhues/ステージが可能である。4の色素および3の別個の強度レベルを用いる場合(不在、半分存在、完全に存在)、 $7^3$ の異なるhue/ステージが可能である。この場合、 $7^3$ の異なるコーディングhueに関する情報を得るのに、わずか4色の画像を獲得するので十分である。

#### 【0183】

好ましい具体例では、本発明により、別個の部位を含む表面を有する第一基質を含むアレイ組成物が提供される。好ましい具体例は部位に分散したマイクロスフィアのポピュレーションを利用し、そのポピュレーションは少なくとも第一および第二サブポピュレーションを含む。各サブポピュレーションは生物活性剤を含み、および加えて、所定の  $pK_a$  を持つ少なくとも一の光学色素を含む。異なる光学色素の  $pK_a$  は異なる。

【0184】

好ましい具体例では、例えばアレイがクローン化された核酸を含む場合、アレイをデコードするのに用いることができるいくつかの方法がある。好ましい具体例では、クローン化された核酸についてのいくつかの配列情報が公知である場合、特異的デコーディングプローブを、本明細書に概説されるように作成することができる。

【0185】

好ましい具体例では、「ランダム」でコーディングプローブを作成することができる。連続ハイブリダイゼーションまたは複数の標識を用いることにより、前記のように、ユニークなハイブリダイゼーションパターンを、各センサーエレメントに関して作成することができる。これにより、所定のクローンを表している全ビーズを同じグループに属するとして同定することが可能となる。該して、これは、配列依存的だが、高度に配列特異的な方法ではないランダムまたは部分的に変性したデコーディングプローブを用いることにより行う。プロセスは、何度も反復することができ、各場合に異なる標識体を用いて、*quesi*-特異的相互作用に基づく異なるシグナルパターンを作成することができる。この方法で、ユニークな光沢特性を各センサーエレメントに関して最終的に作成する。パターン認識またはクラスタリングアルゴリズムを光学特性に当てはめることにより、ビーズを同じ特性を有する(すなわち、同じプローブを持つ)セットにグループ分けすることができる。

【0186】

クローンそのものの実際の配列を同定するために、さらなる操作が必要であり、例えば、直接配列決定を行うことができる。クローンを含む順序付けられたア

レイ、例えばスポットされたcDNAアレイなどを用いることにより、セットにおけるその位置が公知である特異的クローンに対してハイブリダイゼーションパターンを関連付ける「鍵」を作成することができる。この方法において、クローンを回収し、次いでさらに特徴付けることができる。

【0187】

別法として、クローンのアレイは、ベクタータグを用いるバイナリーデコーディングを用いてデコードすることができる。例えば、部分的にランダム化されたオリゴを核酸ベクター(例えば、プラスミド、ファージなど)にクローン化する。各オリゴヌクレオチド配列は、制限されたセットの配列のサブセットからなる。例えば、制限セットが10の配列を含む場合、各オリゴヌクレオチドはいくつかのサブセット(または10の全て)の配列を有してよい。従って、10の配列のそれぞれはオリゴヌクレオチドが存在しても存在しなくてもよい。それゆえ、2<sup>10</sup>または1,024の可能な組み合わせが存在する。配列はオーバーラップしてよく、可能な組み合わせの数を増すために、少数の変種が表されることもできる(例えば、A、C、TおよびG置換)。核酸ライブラリーを、ランダムコード配列を含むベクターにクローン化する。別法として、PCRなどの他の方法を用いてタグを付加することができる。この方法において、クローンのアレイをデコードするための少数のオリゴデコーディングプローブを用いることができる。

【0188】

好ましい具体例では、識別分析およびクラスターアルゴリズムおよびコンピューター装置を用いて、本発明のアレイからデコーディングデータを分析する。複合ステップデコーディングプロセスにフルオロフォアの異なる強度および「 hues」の使用と組み合わせて、本発明に利用される非常に多数のコードは、データの良好に分類することが必要となる。データ、特に強度データは、各段階で異なる色または色の混合物を用いてビーズを可逆的に標識する(例えば、ビーズ上のIBLプローブに対して色素標識された相補的デコーディングオリゴヌクレオチドをハイブリダイズすることによる、または非核酸IBL-DBL対に関する結合リガンド対の形成による)複合ステッププロセスにおいて獲得する。問題は、各段階でペイントする色に関して、ビーズを迅速に分類することである。(光

学画像処理システムにより決定されるように)標識が互いにより密接に関連するほど、分類はより困難となる。

【0189】

画像処理システムにより認められる色素の近接は、デコーディング色素のスペクトル特性および画像処理システムのスペクトルチャンネル分離により決定する。より良好な色の分離を、狭い発光スペクトルを有する蛍光色素を用いることにより、および「ピークにある」色素を励起するよう、および「ピークにある」その発光を測定するべく設計される狭いバンドパス励起および発光フィルターを有する光学システムを用いることにより達成する。ビーズ上の色素を光学画像処理する方法は、我々の脳が、我々の目の中の3の異なる円錐体タイプにおける興奮の比率を測定することにより色を見る、ヒトの視覚プロセスと同様である。しかし、光学画像処理システムを用いて、実際の色のチャンネルの数は、ヒトの目に存在する3よりも大きい。目の円錐体は500-600nmの可視スペクトルに変わるが、画像処理システムに基づくCCDは350nmから850nmまでの色を「見る」ことができる。

【0190】

ビーズアレイをデコーディングする問題は、識別分析分類の問題である。つまり、好ましい具体例において、超スペクトル $\alpha$ 空間における変動の分析は、ビーズ色またはhueの公知のセットにおいて行う。 $\alpha$ スペース中のビーズクラスターの中心は、クラスターの重心と名づけられ、クラスター内のポイントの散乱はクラスターの広がり決定する。確実な分類スキームには、異なるビーズクラス(hues)の重心間の距離が、いずれのクラスタークラスの広がりよりも大きいことが必要である。さらに、重心の位置はファイバー間で、および実験間で一定であるべきである。

【0191】

つまり、好ましい具体例では、hue「ゾーン」は、hue重心を囲み、クラスターの分布半径から広がっている $\alpha$ スペース中の領域として規定する。hue重心の引用セットおよび拡張半径が与えられる場合、経験的に決定されるように、データの新規なセットの分類は、所定のビーズポイントがhueクラスターの

「ゾーン」へ、または「ゾーン」内に落ちるかどうかを調べることにより行うことができる。これは、異なる hue クラスの重心からのビーズポイントの Mahalanobis 距離（この場合、単純にユークリッド距離メートルである）を算定することにより行う。図 3 に示すデータに関して、重心の位置および互いのその距離を、表 2 に示す。

【表 2】

色素 / チャンネル	重心の位置				重心間の距離			
	青	緑	黄	赤	Bod-493	Bod-R6G	Bod-564	Bod-TXR
Bod-493	0.63	0.22	0.11	0.03	0.00			
Bod-R6G	0.03	0.51	0.37	0.09	0.72	0.00		
Bod-564	0.06	0.04	0.57	0.32	0.81	0.55	0.00	
Bod-TXR	0.09	0.05	0.04	0.82	0.99	0.93	0.73	0.00

【0192】

異なるビーズを個々の色相で分類するために、0.3 のユークリッドのディスタンスカットオフ (distance cutoff) を選択した。0.3 のユークリッドまたはマハラノビスの距離を用いる場合、最も近い 2 つの重心である Bod-R6G および Bod-564 (距離 = 0.55) はそれらの解読範囲において少しの重複を有する。分類の改善はこの距離を減少させることにより、および異なる座標軸に適当に重みをつけることにより行うことができる。

【0193】

加えて、本発明はビーズの色を分析し分類するための計算方法を提供する。ビーズの色の分類をハイパースペクトル「アルファ」空間 ( $a_1 = I_1 / S I_i$ 、 $a_2 = I_2 / S I_i$ 、 $a_3 = I_3 / S I_i$ 、など) においてビーズを調べることにより行い、各々の座標軸は与える画像チャンネル内でのフラクションのビーズの強度を意味する。例えば、4 つの画像チャンネルを用いてビーズを映した場合、ビーズの色または色相を 3 次元のアルファ空間の点によりあらわすことができる (4 次元は必ずしも  $S a_i = 1$  からではない)。ビーズを標識化することにより一連の異なる本来の色素を与えると、色素を割合を変化させたり、組み合わせの傾向を変えて、組み合わせることができるため、これらの色素から生じることができる色相の数は限定されない。実用的な色相の数を、ハイパースペクトルアル

ファ空間における異なる色相クラスターの分類により実験的に判断する。

【0194】

図3は4つの別々のイメージングチャンネルで描かれている4つの異なる色相で標識されているビーズのハイパースペクトルアルファプロットを示す。ビーズは4つの区別可能なクラスターを形成することを示す。これらの4つのクラスターがはっきりと分離されているという事実により、強固な解読分類スキームを行うことができる。

【0195】

好ましい具体例において、解読操作の品質管理分析を行う。このことは、各々の解読段階のためにアルファ空間のクラスター分析を行うことにより達成する。判断されたクラスターの数と予測された色相の数により確定する。クラスターの重心の位置をモニターし、予測位置からの偏差に着目する。

すなわち、本発明は本発明のアレイを解読するための装置を提供する。本明細書中で概説されている組成物に加えて、装置には母線を介するメモリーおよび一連の入力／出力装置（例えば、キーボード、マウス、モニター、プリンターなど）で通信する中央演算処理装置を包含する。中央演算処理装置、メモリー、入力／出力装置および母線の間一般的な相互作用は当該分野で周知である。本発明の1つの態様は、メモリーに記録されているハイパースペクトル「アルファ」空間分類システムに指向される。

【0196】

該分類システムプログラムは、光学式読取装置または共焦点顕微鏡（または別のイメージングシステム）からデータを受け取るデータ収集モジュールを包含する。一般的には、分類プログラムは、ハイパースペクトルアルファ空間における変動の分析、クラスターの重心の計算、クラスターの散乱（広がり）の計算および色相の範囲およびディスタンスカットオフを定義することができる分析モジュールを包含する。さらに一般的には、該分析モジュールはマハラノビスの距離を計算することによりデータポイントが色相の範囲内に含まれるかどうかを判断する。

最終的には、該分析モジュールはビーズの位置に生物活性剤を最終的に帰属さ

せるために異なる逐次的な解読情報を分析する。

【0197】

このように、各々の段階でアレイ中の各々のピーズを各々の段階で色相のクラスターに帰属させるための判別分析計算を利用して、逐次的な解読段階を実行する。逐次的な解読情報のビルドアップによりピーズの位置と化学反応とを相互に関連付ける。

【0198】

いったん作成し、本発明の組成物の多数の適用した用途をみいだす。好ましい具体例において、該組成物を標的検体（存在する定量化した標的検体量を包含する）の存在または不在の試料溶液を調査するために使用する。「標的検体」または「検体」または本明細書中の文法的相当語句は、結合相手を検出するか、または評価するかのどちらかを行う原子、分子、イオン、分子イオン、化合物または微粒子を意味する。当業者に認識されているように、多数の検体を本発明に用いてもよく、基本的には、生物活性剤との結合または結合パートナーを探すいかなる標的検体を用いることができる。

【0199】

適当な検体は、生体高分子を含む、有機および無機分子を包含する。標的検体の検出を行う場合、適当な標的検体は環境汚染物質（除草剤、殺虫剤、毒などを含む）、化学物質（溶媒、ポリマー、有機物質などを含む）、治療分子（治療および覚せい剤、抗体などを含む）、生体高分子（ホルモン、サイトカイン、タンパク質、核酸、脂質、炭水化物、細胞膜抗原および受容体（神経の、ホルモンの、栄養素および細胞表面受容体）またはそれらのリガンドなどを含む）、全細胞（原核生物（例えば、病原菌）および真核生物細胞を含む、哺乳動物の腫瘍細胞を含む）、ウィルス（レトロウィルス、ヘルペスウィルス、アデノウィルス、レンチウィルスなど）および胞子を包含するが、限定するものではない。特に好ましい検体は核酸およびタンパク質である。

【0200】

好ましい具体例において、標的検体はタンパク質である。当業者に認識されているように、本発明を用いて結合パートナーを検出または評価しうる可能なタン



パク質性標的検体が多数存在する。適当なタンパク質標的検体は（１）免疫グロブリン、（２）酵素（および別のタンパク質）、（３）ホルモンおよびサイトカイン（細胞受容体用リガンドとして供する多くのもの）および（４）別のタンパク質を包含するが、限定するものではない。

#### 【0201】

好ましい具体例において、標的検体は核酸である。一般的に、U. S. S. N. s 60 / 160027、60 / 161148、09 / 425633および60 / 160917（出典明示により本明細書の一部とする）で概説されているように、これらのアッセイは広範囲の適用における用途を見出されている。

#### 【0202】

好ましい具体例において、該プローブを遺伝子診断に用いる。例えば、プローブを本明細書記載の手法を用いて作成し、標的配列、例えば、非腺腫性大腸癌の遺伝子、BRCA1乳癌遺伝子、種々の癌に関連する遺伝子であるP53、アルツハイマー疾患の大きな危険性を有するAPOE4遺伝子、患者の発病前の容易なスクリーニング、嚢胞性線維症遺伝子における変異、チトクロムP450sまたは当業者に周知の別のいかなる物を検出することができる。

#### 【0203】

さらなる具体例において、ウイルスおよびバクテリアの検出を本発明の複合体を用いて行う。この具体例において、プローブを設計し、種々のバクテリアおよびウイルスから標的配列を検出する。例えば、現在の血液スクリーニング法は抗HIV抗体の検出をもちにしている。本明細書中に開示されている方法は臨床的な試料の直接スクリーニングを可能にし、HIV核酸配列、特に、極めて保存されているHIV配列を検出する。加えて、抗ウイルス治療の効果の評価の改良方法として、患者内の環状ウイルスの直接的なモニタリングを可能にする。同様に、白血病に関連するウイルスである、HTLV-IおよびHTLV-IIをこの方法で検出してもよい。また、バクテリアの感染、例えば、結核、クラミジアおよび別の性感染症を検出してもよい。

#### 【0204】

好ましい具体例において、本発明の核酸は水および食物試料のスクリーニング

での有毒なバクテリアのためのプローブとしての用途を見出した。例えば、試料は核酸を放出するバクテリアを溶解させるための処置をし、次いで、プローブは菌種（限定するものではないが、例えば、病原株としては、サルモネラ菌、カンピロバクター菌、コレラ菌、リーシュマニア、大腸菌の腸毒素株およびレジオネラ症バクテリアを包含する）の見分けがつくように設計した。

【0205】

さらなる具体例において、該プローブは犯行現場のDNAと被害者および被疑者から採取した試料を照合する「DNA指紋採取」に使用する。

さらなる具体例において、アレイでの該プローブはハイブリダイゼーションによる配列決定に使用する。

【0206】

また、本発明は標的核酸配列における変異またはミスマッチの検出法としての使用を見出す。例えば、現在の焦点は、多型DNAマーカーの使用による遺伝的変異と発現型との関係の分析にある。以前の研究では、多型ポジショナルマーカーとしての短い縦列反復（STRs）を利用したが、現在の焦点は、ヒト遺伝的DNAにおいて1キロベースあたり平均して1回以上の頻度で起こる単一ヌクレオチド多型（SNPs）である。特に、コード配列の中および周囲でのSNPsは治療的に関連した表現型変種の直接的原因である可能性が高い。周知の多型の多くは臨床的に重要な表現型に起因し、例えば、apoE2/3/4変種はアルツハイマーおよび別の疾患のさまざまな相対危険度を伴う（Cordorら、Science 261（1993））。オリゴヌクレオチドアレイへの次のハイブリダイゼーションでのSNP座の多重PCR増幅は、少なくとも何百ものSNPsを同時に遺伝子型を特定する正確で、確実な方法であることを示す（Wangら、Science, 280:1077(1998)を参照；また、Schaferら、Nature Biotechnology 16:33-39(1998)を参照）。本発明の合成は先の技術のアレイを代用していてもよく、特に、一塩基伸長（single base extension）およびピロシーケンス（pyrosequencing）法は本発明の組成物に有用である。

【0207】

好ましい具体例において、本発明の組成物を生物活性剤を選別するために用い

、標的分子と結合し、好ましくはその機能を変化させる物質を見出す。前記したように、多種多様の異なるアッセイ形式を、当該分野で周知のように実行してもよい。一般的には、望ましい結合パートナーのための標的検体を標識し、生物活性剤による標的検体の結合により、次の検出で結果として標識したビーズの補充を行う。

【0208】

好ましい具体例において、生物活性剤および標的検体の結合は特異的であり、すなわち、生物活性剤は標的検体に特異的に結合する。本明細書における「特異的結合」とは、検体と別の構成要素または試験試料の汚染物質とを見分けるのに十分な特異性で、該剤が検体に結合することを意味する。しかしながら、当業者に認識されているように、格別特異的でない結合を用いて検体を検出することは可能であり、該システムは異なる結合リガンド、例えば、異なるリガンドのアレイを用いてもよく、個々の検体の検出は「エレクトロニック・ノーズ (electronic noses)」研究での操作に類似する結合リガンドのパネルに結合する「特徴」による。これは化学的検体の検出において特に有用である。結合は、非特異的結合を排除するための洗浄段階を包含するアッセイ条件下で結合したままであるのに十分なものであるべきであるが、ある具体例において、低い親和性の結合パートナーを検出するためには洗浄段階は望ましくない。いくつかの具体例において、対の解離定数は約  $10^{-4} \sim 10^{-6} \text{ M}^{-1}$  未満であり、約  $10^{-5} \sim 10^{-9} \text{ M}^{-1}$  未満が好ましく、約  $10^{-7} \sim 10^{-9} \text{ M}^{-1}$  未満が特に好ましい。

【0209】

一般的には、標的検体が少なくとも1つの生物活性剤と結合するために適当な条件、すなわち、一般に、生理学的条件下で、標的検体を含む試料（標的検体の検出用か、または標的検体の結合パートナーのスクリーニング用）をアレイに加える。次いで、標的検体の存在または不在を検出する。当業者に認識されているように、これは種々の方法で行われ、一般に、光信号における変化の使用を用いて行われる。この変化は多くの異なる機構を介して起こりうる。ある具体例は、色素標識検体とビーズの結合、ビーズ上または近くの色素種の生成、存在する色

素種の破壊、ビーズ上の色素と相互作用する検体に対する光学的特徴の変化、または別の光学的応答を包含する。

【0210】

好ましい具体例において、光信号の変化は、検出可能な標識、好ましくは光学的標識（例えば、蛍光色素）で直接的または非直接的に標識されている標的検体の結合の結果として起こる。すなわち、一例を挙げると、タンパク質性標的検体を使用した場合、直接または非直接的に、例えば、標識されている抗体の使用を介して蛍光で標識してもよい。

【0211】

同様に、核酸を、例えば、当該分野で周知のPCR増幅の間に蛍光で容易に標識してもよい。代わりに、標的配列の結合に際してハイブリダイゼーションインジケータを標識として用いてもよい。ハイブリダイゼーションインジケータは、たいてい可逆的に優先的に2本鎖の核酸に伴う。ハイブリダイゼーションインジケータはインカレーターおよび副および／または主溝結合部分を包含する。好ましい具体例において、インカレーターを用いていてもよく、インカレーターは一般的に2本鎖の核酸の存在下でのみ起こるため、標的ハイブリダイゼーションの存在だけでは標識は発光するであろう。すなわち、標的検体と生物活性剤との結合に際して、その部位で生じる光信号があり、次いで検出される。

【0212】

代わりに、ある場合において、前記したように標的検体、例えば、酵素は直接的または非直接的な光学的に検出可能な種を生じる。

【0213】

さらに、ある具体例において、光学的特徴の変化は光信号の基盤であるとしてもよい。例えば、ある化学的な標的検体とビーズ上のある蛍光色素との相互作用は光学的特徴を変え、すなわち異なる光信号を生じる。

【0214】

当業者に認識されているように、ある具体例において、標的検体の存在または不在を別の光学または非光学信号の変化を用いて行ってもよい（表面増強ラマン分光、放射能などを包含するが、限定するものではない）。

## 【0215】

当業者に認識されているように、該アッセイを種々の実験条件下で行ってもよい。反応はアッセイに含まれる様々な他の試薬を包含する。これらとしては、塩、緩衝液、中性タンパク(例えば、アルブミン)、界面活性剤などの試薬が挙げられる。これらは最適なタンパク質・タンパク質結合および検出を容易にし、および/または非特異的なもしくはバックグラウンドの相互作用を減少させるのに用いる。また、試料の調製方法および標的に純度に依存して、それ以外にアッセイの効率を向上させる試薬(例えば、プロテアーゼ阻害薬、ヌクレアーゼ阻害薬、抗菌薬など)を用いてもよい。必須の結合を提供する、組成物の混合物を任意の順序で加えてもよい。種々の遮断および洗浄段階を当該分野で周知のように利用してもよい。

## 【0216】

好ましい具体例において、二色の(two-color)競合ハイブリダイゼーションアッセイを行う。これらのアッセイは慣用的なサンドイッチアッセイに基づいて行うことができる。該ビーズは標識配列を捕獲するSNPの片方(上流または下流)に位置する捕獲配列を含有する。異なる蛍光物質で各々標識されている2つのSNP対立遺伝子特異的プローブを標識配列にハイブリダイズする。一般的によりよい結合を示す正しい配列とともに、遺伝子型を2つの信号比から得ることができる。これは標的配列自身を標識する必要がないという利点を有する。加えて、該プローブは競合しているため、このことは結合条件を最適化する必要がないことを意味する。ミスマッチなプローブを安定に結合させる条件下で、マッチしたプローブはそれにとって変わることができる。それゆえ、該競合アッセイはそれらの条件下でよりよい識別を提供することができる。多くのアッセイは並列して行うため、条件を同時に全てのプローブのために最適化することはできない。それゆえ、ミスマッチな識別にとって最適でない条件を補うように競合アッセイシステムを使用することができる。

## 【0217】

好ましい具体例において、ジデオキシヌクレオチド・チェーンターミネーター配列決定を本発明の組成物を用いて行う。この具体例において、DNAポリメラ

ーゼを蛍光標識した ddNTPs を用いたプライマーの伸長のために用いる。プライマーの 3' 末端は SNP 部位に隣接して位置している。このように、単一塩基伸長は SNP 部位の配列に相補的である。各々の塩基につき一つで、4 つの異なる蛍光物質を用いることにより、SNP 配列を 4 つの塩基特異的な信号を比較することにより推論することができる。これは種々の方法で行ってもよい。第一の具体例において、捕獲プローブを伸長することができ、このアプローチにおいて、該プローブをビーズ上の 5' から 3' に向かって合成、または 5' 末に取り付け、ポリメラーゼ伸長用の遊離の 3' 末を得る必要がある。代わりに、サンドイッチ型アッセイを用いることができ、この具体例において、該標的をプローブによりビーズ上で捕獲し、ついで、プライマーをアニールし、伸長させる。後者の場合において、該標的配列を標識する必要はない。加えて、サンドイッチ型アッセイは 2 つの特異的な相互作用を必要としているため、複合体試料の分析に特に適しているさらなるストリンジェンシーを提供する。

加えて、標的検体および該 DBL のどちらもが該薬剤と結合する場合、競合の解読を介して標識していない標的検体の検出を行うことができる。

#### 【0218】

好ましい具体例において、本発明の方法はアレイ品質管理に有用である。本発明前に、いかなる方法にも全てのアレイ上の全てのプローブの性能のポジティブ試験を提供することは記載されていない。アレイ解読はこの試験を提供するだけでなく、過程自身を解読する間に生じるデータを利用することにより行われる。それゆえ、付加実験は必要でない。本発明はソフトウェアで解読できる一連のデータの分析アルゴリズムを必要とする。

#### 【0219】

品質管理操作はアレイにおける幅広いシステマティックなランダムな問題を同定することができる。例えば、塵または別の混入物のランダムな一片はある検出器に不適當な信号を与える原因となり、これは解読中に検出することができる。複合的なアレイからの 1 つ以上の薬剤の欠如を検出することができる。この品質管理操作の利点はアッセイの直前に行うことができることにあり、各々の検出器の真の機能試験といえるところである。それゆえ、アレイの組み立てと実用性の

間に起こるに違いない、いかなる問題もみつけることができる。高レベルの信頼性が必要であり、および／または検出器故障の深刻な見込みがある適用において、解読および品質管理を実際の試料分析の前後で行うことができる。

【0220】

好ましい具体例において、該アレイを試薬の品質管理を行うために用いることができる。多くの場合において、生体高分子を試薬として用い、品質を管理しなくてはならない。例えば、オリゴヌクレオチドプローブの多くを試薬として提供してもよい。多数の異なる生体高分子の品質管理を行うことは典型的に難しい。本明細書記載のアプローチを用いて、アレイの代わりの変数として試薬（DBLsとして処方）を処理することにより行うことができる。

【0221】

好ましい具体例において、本明細書中に概説した方法をアレイキャリブレーションに用いる。多くの適用、例えば、mRNAの定量のために、標的検体の濃度に対して直線的な応答である信号を有することが望ましく、または、もし非直線的であれば、濃度と信号の関係を調べ、標的検体の濃度を推定することができる。したがって、本発明はアレイにおける複合的なピーズのための並列したキャリブレーションな曲線を作る方法を提供する。キャリブレーションな曲線を分析するのに複雑な試料をシミュレートする条件下で作ることができる。同時のアレイ用の別の曲線を除いて、各々の曲線を他のものと無関係に構築することができる（例えば、異なる範囲の濃度）。すなわち、この具体例において、異なる蛍光物質よりむしろコード「標識」として用いて、逐次的な解読スキームを異なる濃度で行う。このように、濃度経の応答のような信号を各々のピーズで測定することができる。このキャリブレーションを直前のアレイを用いて行うことができ、全てのアレイ上の全てのプローブを必要に応じて個々にキャリブレートする。

【0222】

好ましい具体例において、本発明の方法をさらなるアッセイ開発に用いることができる。すなわち、例えば、該方法はプローブよし悪しの同定ができ、当業者に認識されているように、あるプローブはうまくハイブリダイズしないためか、または1つ以上の配列と架橋ハイブリダイズするためうまく機能しない。これら

の問題を解読の間に容易に見つける。プローブの能力を速やかに見積もる能力は、アッセイ開発の時間および費用を大きく減少させる可能性を有する。

【0223】

同様に、好ましい具体例において、本発明の方法はアッセイ開発における定量に有用である。多くのアッセイの主な難問は、関連した検体の複合的な混合物の存在下で、試料と検体との濃度の違いを見分ける能力、これらの違いを定量および検体の確かな濃度を測定する能力である。この問題の例は全細胞のmRNA存在下での特異的mRNAの定量である。mRNA定量の基準として構築されている1つのアプローチは複合的なマッチおよびミスマッチなプローブ対を利用することである（Lockhartら、1996（出典明示により全てを本明細書の一部とする））。このアプローチは単純であるが、比較的多くのプローブを必要とする。このアプローチにおいて、濃度に対する定量的な反応を所定の遺伝子または配列への一連の異なるプローブからの信号を平均することにより得る。あるプローブだけが定量的に反応するため、これらのプローブを確実に予測することは不可能である。予備的知識の欠如において、適当に選択して集めたプローブの平均的反応は定量的である。しかしながら、本発明において、これは一般的に別のアッセイと同様なアッセイに基づく核酸に適用することができる。本質的には、該アプローチは、別のプローブでそれらを平均するよりむしろ、個々のアッセイにおける定量的に反応するプローブを同定することである。このことは前記したキャリブレーションアレイスキームを用いて行い、濃度に基づくコードを用いる。このアプローチの利点は、少しのプローブしか必要としないこと、測定の精度が使用したプローブにあまり依存しないこと、および各々および全ての配列が効率的な操作で試験できるため、検出器の感度が確実に高レベルであると知られていることを包含する。実験的にうまく選択され、予測したプローブ能力、特に、複合体配列混合物中での問題および不確定さを回避するプローブを言及することは重要である。その一方で、順序づいたアレイでのデータを記載した実験において、比較的少数の配列を、周知のmRNAを混合物に加えて、定量的なスパイク（spiking）実験を行うことにより確認する。

【0224】



好ましい具体例において、cDNAアレイはRNA発現解析に最適である。この具体例において、個々のcDNAクローンを宿主ベクター系で増殖させたcDNAライブラリーから増幅させる（例えば、PCRを用いて）。各々の増幅させたDNAをビーズの集団に付着させる。異なる集団をともに混合し、cDNAライブラリーに相当するビーズの集団を作成する。該ビーズをアレイし、前記したように解読し、アッセイに用いる（本明細書中で概説したように、解読は十分なアッセイの後に起こりうる）。該アッセイを摘出し、必要に応じて標識し、さらにアレイにハイブリダイズされているRNA試料（全細胞またはmRNA）を用いて行う。比較分析は個々のRNA発現レベルにおける検出の相違を考慮する。適切なキャリブレーション基準の比較はRNAの絶対量を定量化させる。

#### 【0225】

また、cDNAアレイをマッピング、例えば、遺伝子中、例えば、腫瘍または別の組織試料から欠如/挿入または複写の数の変化をマップすることで代用することができる。このことはゲノムのDNAをハイブリダイズすることにより行うことができる。cDNAs（またはESTsなど）の代わりに、ランダムゲノムフラグメント（random genomic fragment）を包含する別のSTS（配列標識部位）をこの方法でアレイすることができる。

本明細書に引用されている全ての言及は出典明示により全体を本明細書の一部とする。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】 図1A、1B、1C、1Dおよび1Eは、本発明のいくつかの異なる「二成分」系の実施態様を示す図であり、図1C～Fは、複数の第1基材の使用を示す図である。

【図2】 図2Aおよび図2Bは、2つの異なる「一成分」系を示す図である。

【図3】 図3は、ハイパースペクトルアルファ空間における集落形成を示す図である。

【図4】 図4は、FAM標識オリゴ補体またはCy3標識オリゴ補体のいずれかを用いてアレイ上の異なる種類のビーズを彩色（標識）する二色解読法を

示す図である。

【図5】 図5は、4種類の色および4つの解読段階を用いる128種類のビーズの解読を示す図である。

【図6】 図6は、16種類のビーズのグレースケール解読を示す図である。

【図7】 図7は、蓋およびベースプレートの略図である。

【図8】 図8は、蓋10およびベースプレート60を含むハイブリダイゼーションチャンバーの略図である。

【図9】 図9は、穴105を有するベースプレートを示す図である。

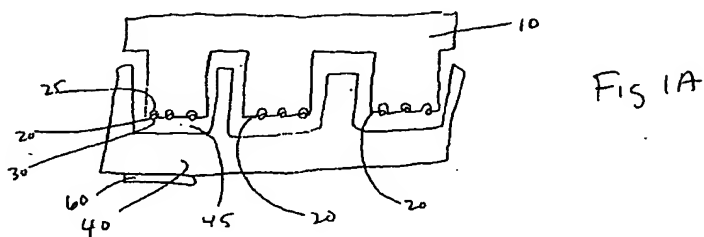
【図10】 図10は、加圧および／または減圧によって引き起こされる膜上の可変の溶液容積および局在化を示す図である。

【図11】 図11は、ハイブリダイゼーションチャンバーについての使用を見出す代表的なアッセイスキームのフローチャートである。

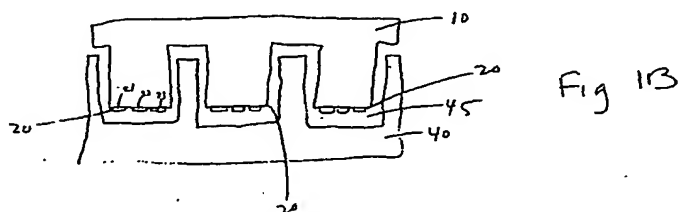
【図12】 図12は、顕微鏡用スライドフォーマットにおけるアレイ・オブ・アレイズを示す図である。

【図13】 図13は、アレイを調製するための金型を示す図である。

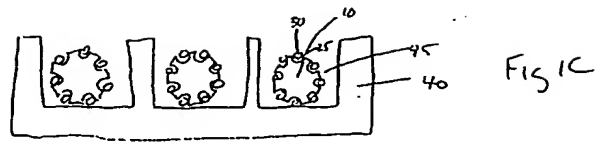
【図1A】



【図1B】



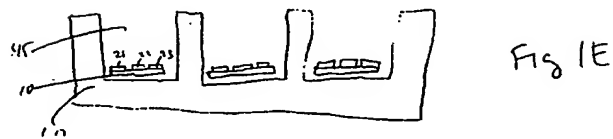
【图 1 C】



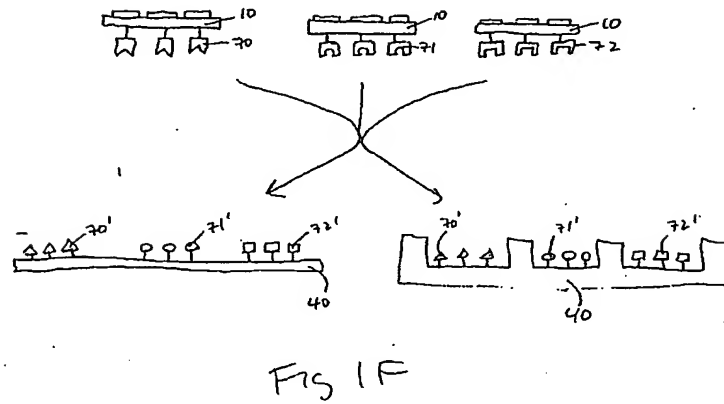
【图 1 D】



【图 1 E】



【图 1 F】



【図2】

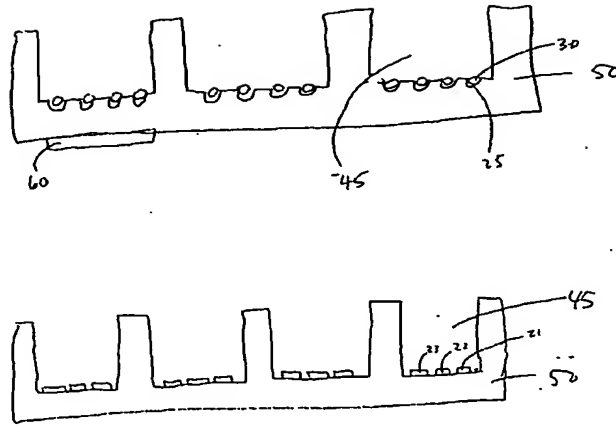


Fig 2

【図3】

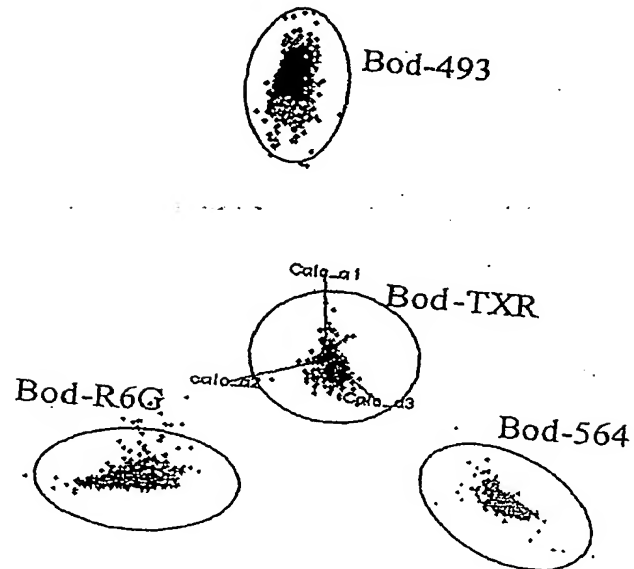


Fig 3

【図4】

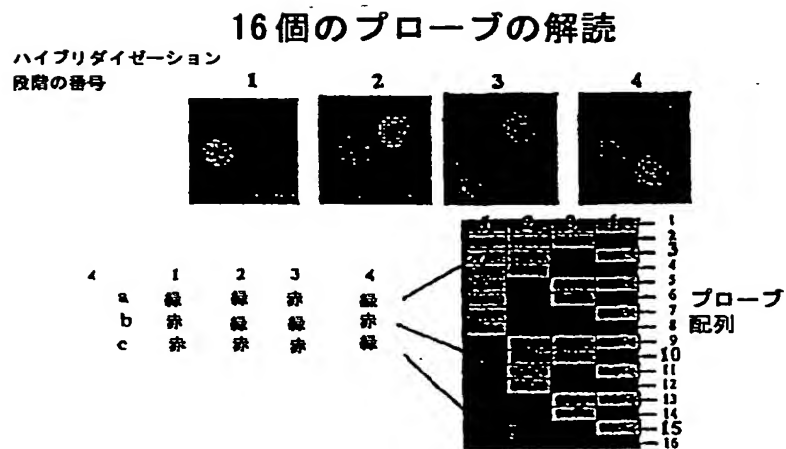


Fig 4

【図5】

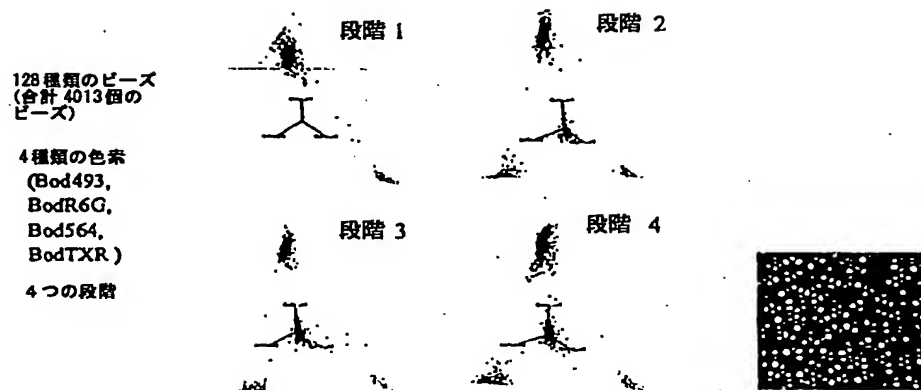


Fig 5

【図6】

## グレースケール解読

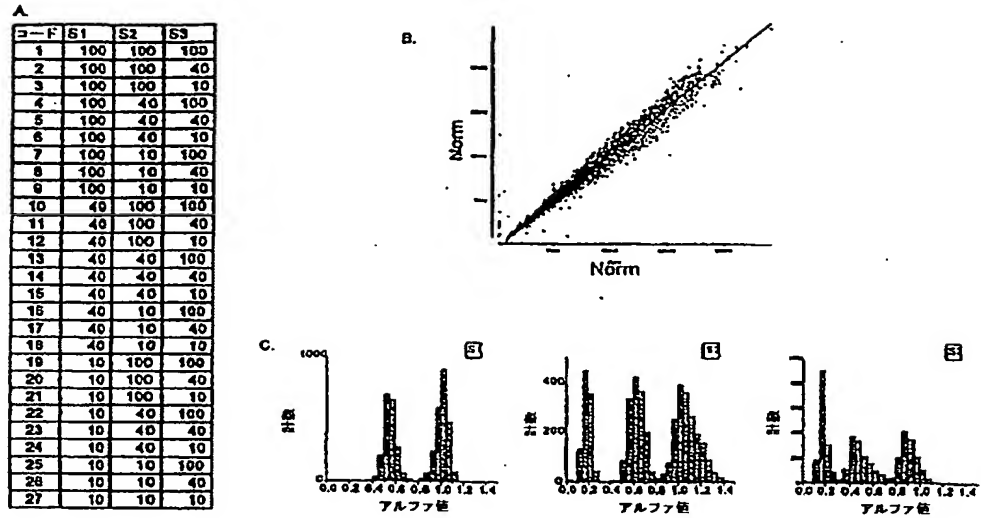
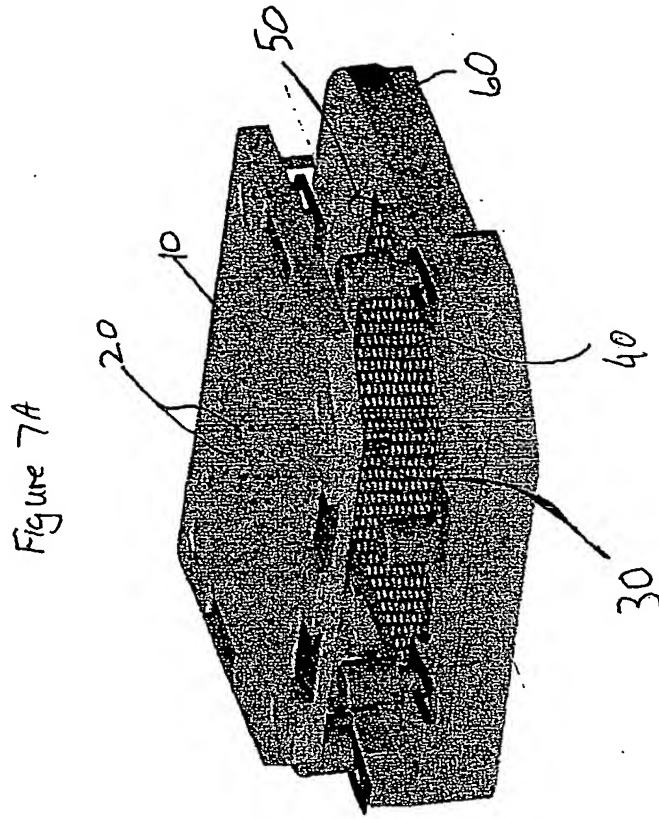


Fig 6

【図7A】



【図7B】

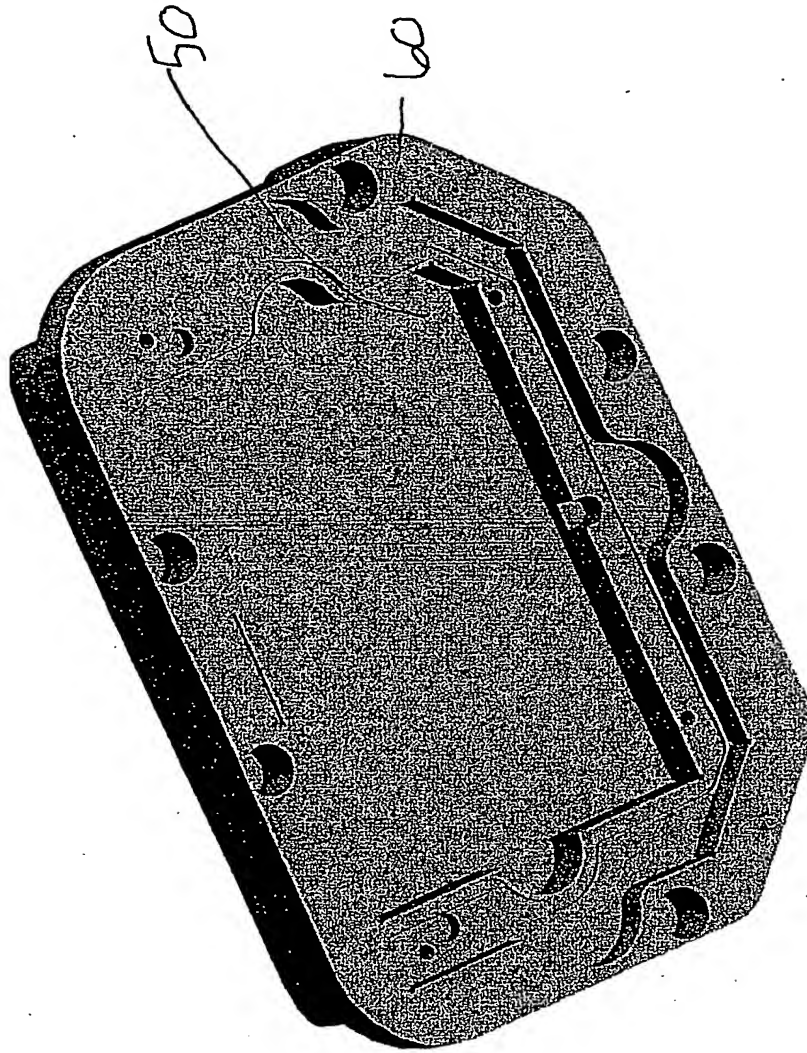
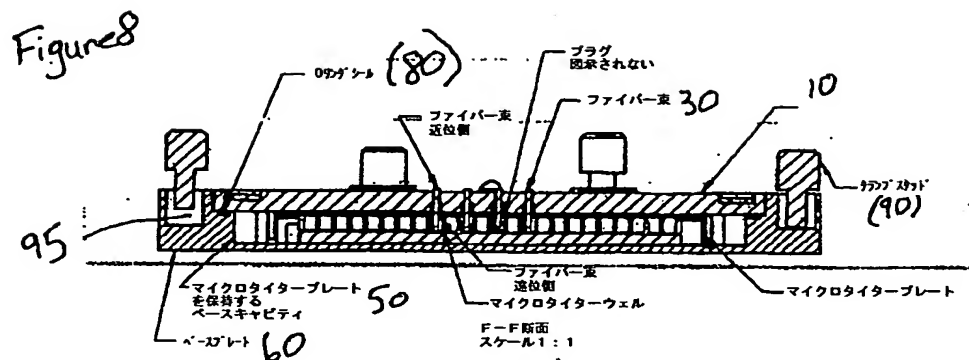


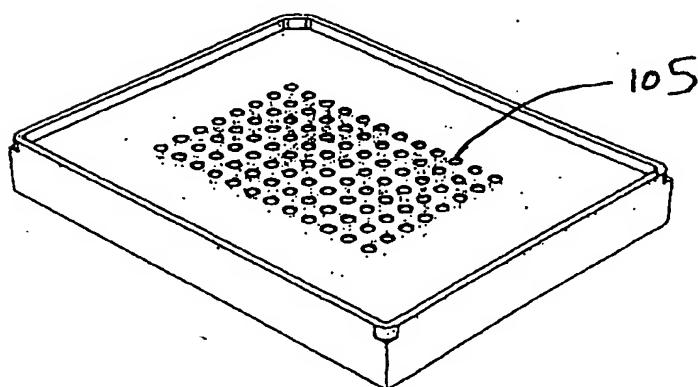
Figure 7B



【圖 8】

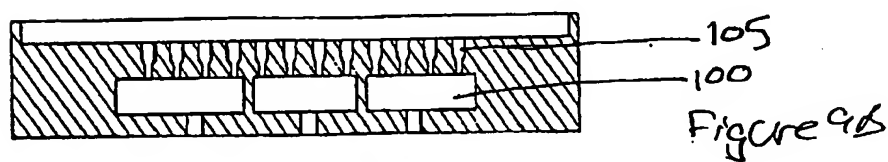


【図 9 A】



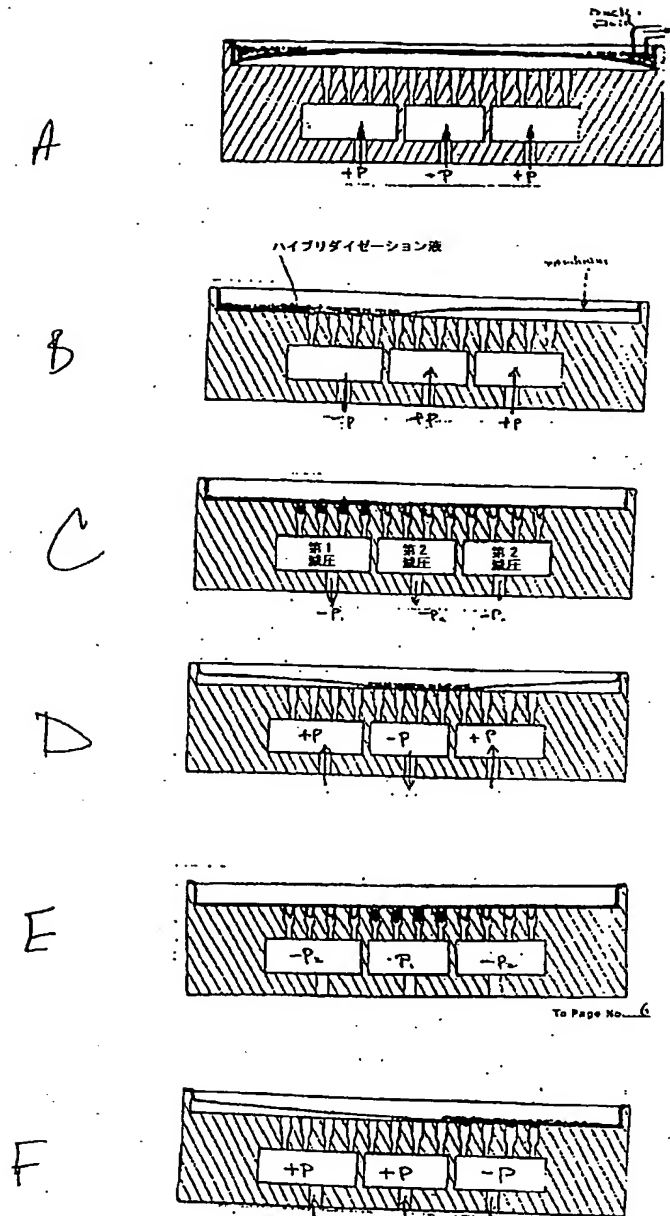
**Fig. 1** ベースブロックコンセプト、等角図

【図 9 B】



**Fig. 2** ベースブロックコンセプト、側断面図

【図10】



【図11】

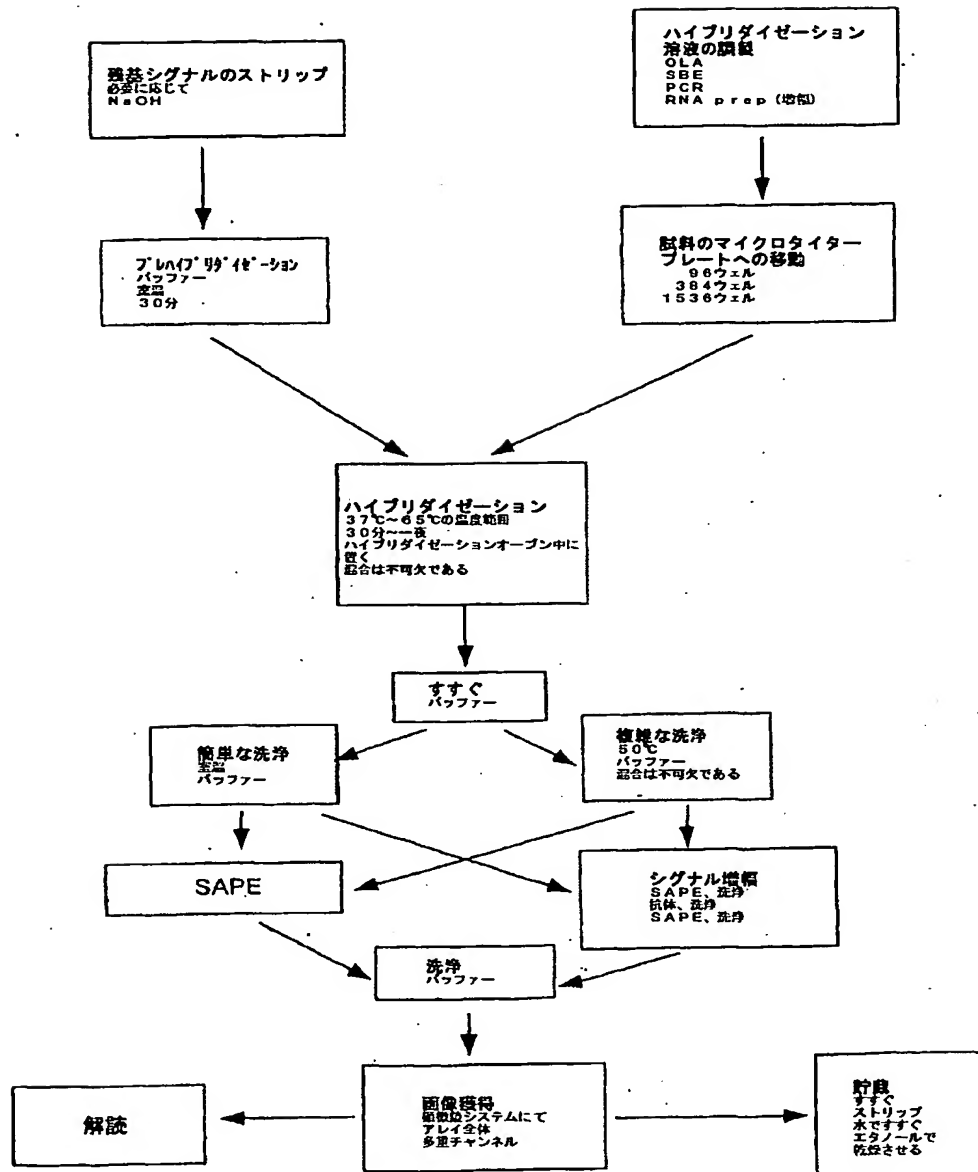


Figure 11

【図 1 2】

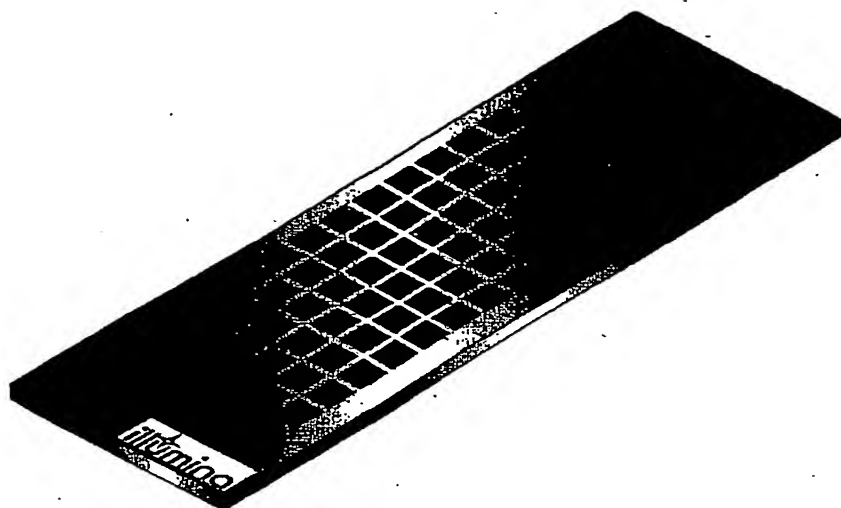


Figure 12

【図13】

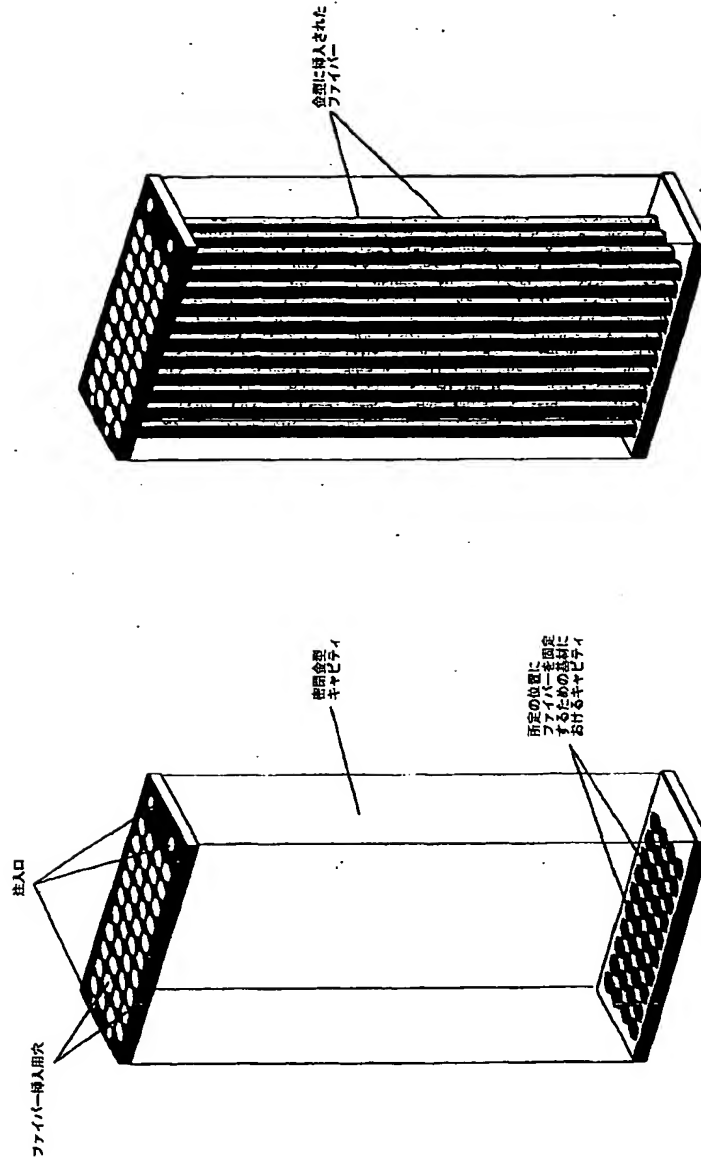


Figure 13

## 【國際調查報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Internal / Application No  
 PCT/US 01/04504

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 GOIN21/25 GOIN21/64		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 GOIN		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, PAJ, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WO 00 71992 A (ILLUMINA INC) 30 November 2000 (2000-11-30) cited in the application page 4, line 25 - line 35 page 4, line 44 - page 5, line 20 page 8, line 7 - line 18 page 9, line 15 - line 21 page 11, line 25 - line 30 page 17, line 28 - line 32 page 20, line 10 - line 22	1-4, 15, 18-25
X, P	WO 00 39587 A (ILLUMINA INC) 6 July 2000 (2000-07-06) page 4, line 10 - page 5, line 7 page 7, line 16 - line 25 page 7, line 36 - line 39 figure 1	1-4, 15, 18-25
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
<b>* Special categories of cited documents:</b>		
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 August 2001		Date of mailing of the international search report 06/09/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Navas Montero, E

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.  
PCT/US 01/04504

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	US 6 129 896 A (NOONAN JAMES ET AL) 10 October 2000 (2000-10-10) column 4, line 45 - line 55; figure 4	26
A	WO 99 67641 A (ILLUMINA INC) 29 December 1999 (1999-12-29) the whole document	1, 5, 16

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat. Application No.

PCT/US 01/04504

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0071992 A	30-11-2000	AU 5275900 A	12-12-2000
WO 0039587 A	06-07-2000	AU 2391600 A	31-07-2000
US 6129896 A	10-10-2000	AU 4324100 A	24-07-2000
		WO 0040942 A	13-07-2000
WO 9967641 A	29-12-1999	AU 4831599 A	10-01-2000
		EP 1090293 A	11-04-2001



## フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>  
G01N 37/00

識別記号  
102

FI  
G01N 37/00

テーム(参考)  
102

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW

Fターム(参考) 2G043 AA01 BA16 DA02 DA05 EA01  
FA01 FA02 GA07 GB01 GB16  
HA05 KA02 LA03  
2G054 AA10 CA22 FA16 FA28 GA04  
2G057 AA04 AB01 AC01 BA01 BA03  
BB06  
2H052 AE02 AE03 AE04 AE05 AE12  
AE13

## 【要約の続き】

